

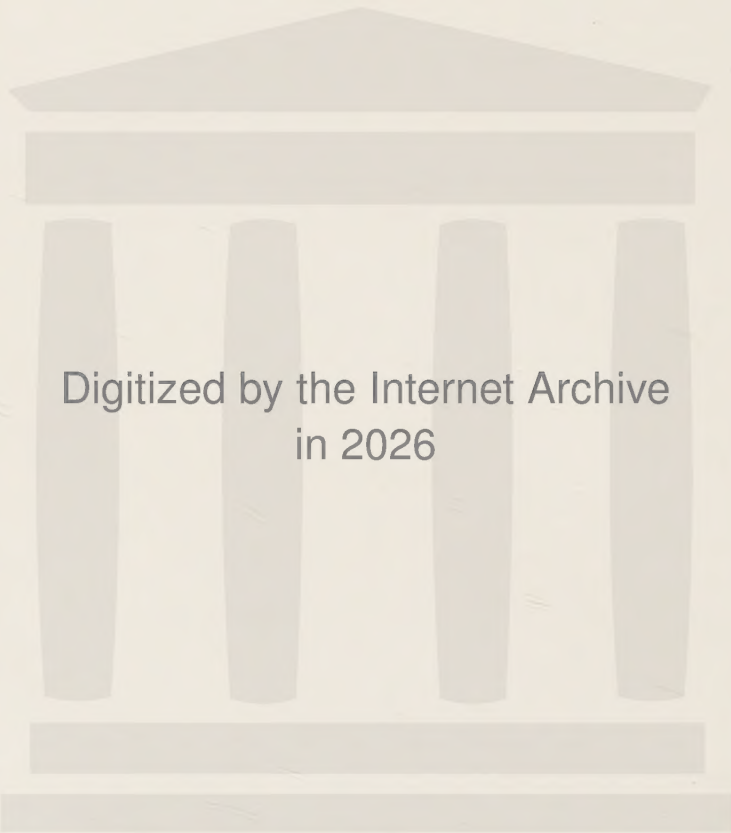
Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Coxiella burneti* in Aerosolen durch das Impinger- und Gelatinefilterverfahren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Ralph Scheffler
Tierarzt aus Breslau

Gießen 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546402_0041

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Coxiella burneti* in Aerosolen durch das Impinger- und Gelatinefilterverfahren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Ralph Scheffler
Tierarzt aus Breslau

Gießen 1974

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Frimmer

Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Schliesser

Tag der mündlichen Prüfung: 11.6.1974



Meinen Eltern
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>1. Einleitung</u>	1
<u>2. Literatur</u>	
2.1. Coxiella burneti	
2.1.1. Eigenschaften	2
2.1.2. Übertragungswege	3
2.1.3. Nachweisverfahren	5
2.2. Aerosole	11
2.3. Herstellung künstlicher Aerosole	13
2.4. Rückgewinnung der Keime aus der Luft	15
2.5. Leistungsvergleich zwischen verschiedenen Keimsammelverfahren	20
<u>3. Eigene Untersuchungen</u>	
3.1. Material	23
3.2. Methoden	
3.2.1. Versuchsaufbau	26
3.2.2. Herstellung der Keimsuspensionen und Aerosolierung	28
3.2.3. Aerosolrückgewinnung	29
3.2.4. Nachweisverfahren	30
3.2.5. Mischantigenverneblung	33
3.3. Ergebnisse	35
3.3.1. Orientierende Vorversuche mit Serratia marcescens	
3.3.2. Hauptversuche mit Coxiella burneti	
a) Keimrückgewinnung bis zur Nachweisgrenze	
b) Verneblung eines Coxiellen/Bak- terienmischs	44

3.4. Besprechung und vergleichende Auswertung der Ergebnisse	46
a) Vergleich der verschiedenen Färbungsmethoden	
b) Prozentuale Rückgewinnung bei den verschiedenen Verfahren	48
c) Leistungsvergleich zwischen Impinger und Gelatinefilter	49
 <u>4. Diskussion</u>	
4.1. Aerosolversuche mit <i>Serratia marcescens</i>	52
4.2. Aerosolversuche mit <i>Coxiella burneti</i>	54
 <u>5. Zusammenfassung</u>	60
 <u>6. Literatur</u>	61
 <u>7. Lebenslauf</u>	

1. Einleitung

Coxiella burneti ist der Erreger der in Deutschland und vielen anderen Ländern sporadisch bei Tieren (vor allem Rind und Schaf) auftretenden Zoonose Q-Fieber. Bei der Ansteckung steht als wichtigster Infektionsweg die aerogene Erregerübertragung im Vordergrund. Rechtzeitige und wirkungsvolle Bekämpfungsmaßnahmen sind von einer raschen und sicheren Diagnose abhängig. Aus diesem Grund ist es wichtig, eine Schnellmethode zum Nachweis von Coxiella burneti aus der Luft zur Verfügung zu haben, um geeignete präventive und curative Maßnahmen einleiten zu können.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, bis zu welchem Coxiellengehalt in einer definierten Luftmenge sich die Q-Fieber-Erreger sicher nachweisen lassen. Dabei sollten die Luftprobenentnahmen nach dem Impinger- und dem Gela-tinefilterverfahren vorgenommen und verschiedene Nachweisverfahren und Färbetechniken vergleichend untersucht werden.

2. Literatur

2.1. Coxiella burneti

2.1.1. Eigenschaften

Coxiella burneti (C.b.) wurde von DERRICK, BURNET und FREEMANN 1937 erstmals beschrieben und isoliert.

C.b. ist ein obligater, intracellulärer Mikroorganismus von pleomorpher Struktur, der sich mit Anilinfarben leicht färbt. Es ist 0,25 - 0,5 nm groß, unbeweglich, hat kokkoides bis bipolares oder lanzettähnliches Aussehen und ist im Ausstrich einzeln, in kurzen Ketten oder kleinen Häufchen angeordnet.

Das Wirtsspektrum von C.b. ist sehr groß. Empfänglich sind Schafe, Ziegen, Rinder, Menschen, sowie alle gebräuchlichen Laboratoriumstiere (SCHMIDT 1969). Nach experimenteller Infektion lassen sich vor allem beim Meerschweinchen in Leber- und Milzausstrichen reichlich Coxiellen nachweisen. Ein natürliches Reservoir für C.b. bilden Arthropoden.

Die Vermehrung außerhalb empfänglicher Wirtstiere erfolgt nur in lebenden Zellen, wie im Dottersack bebrüteter, embryonierter Hühnereier oder in Gewebekulturen, besonders von Hühnerembryofibroblasten und L-Zellen (RHODE 1973).

Die Resistenz der Erreger gegenüber physikalischen und chemischen Noxen ist unter bestimmten Bedingungen sehr hoch. So hält sich der Erreger z. B. im Zeckenkot und Staub monate- bis jahrelang (586 Tage) (PHILIPP, 1948) und in getrockneten Zecken über 10 Jahre infektionstüchtig (SHMAJEWA und Mit. 1964). In Leitungswasser überleben Q-Fieber Rickettsien rund 160 Tage (KULAGIN, SOKOLOVA, FEDOVORA 1956). Nur Temperaturen von 100 °C töten Coxiellen mit Sicherheit ab (BINGEL und ENGBELHARDT 1952, SCHAAF 1962). 0,2 % Formalin- und 0,4 % Phenollösung töten C.b. erst nach mehreren Tagen ab (RIVERS 1948). 1 % Sagrotanlösung wirkt nach 15 Minuten, 70%iger Alkohol und Äther nach 1 - 2 Minuten abtötend (KIRBERGER 1951).

2.1.2. Übertragungswege von C.b.

Als Übertragungswege von C.b. auf Mensch und Tier kommen hauptsächlich 3 Wege in Frage:

- a) Übertragung durch Zecken
- b) peroraler Infektionsweg
- c) aerogene Übertragung

a) Die Übertragung durch Zecken gilt vor allem für Tierpopulationen. C.b. lebt intrazellulär in Zecken, die den Erreger durch Biß, über den Speichel und über den Kot (REHACEK und BREZINA 1968) unter Haus- und Wildtieren verbreiten. Damit bilden die Zecken das primäre Erregerreservoir in der Natur.

b) Von geringerer Bedeutung ist der orale Infektionsweg. Es kommen vor allem infizierte Lebensmittel wie Milch, Milchprodukte und Fleisch in Betracht (WHO 1967), wobei eine Infektion nur haftet, wenn eine große Erregermenge vorhanden ist und die Virulenz der Stämme hoch ist (BABUDIERI und MOSCOVICI 1955, KLEINSORGEN 1972).

c) Bei der Ansteckung des Menschen und der Tiere steht vor allem der aerogene Infektionsweg im Vordergrund. Nach DERRICK sollen (1961) 90 - 95 % aller Infektionen durch aerogene Übertragung zustandegekommen sein, wobei besonders erregerrhaltige, eingetrocknete Ausscheidungen wie Kot, Urin, Milch und Fruchtwasser eine Rolle spielen. Nach Antrocknung der Ausscheidungen, durch die die Infektiosität der Coxiellen nicht beeinträchtigt wird, sind auch noch später Ansteckungen durch Inhalation von erregerrhaltigem Staub möglich (SCHLIESSER 1968). Gerade diese Staubinfektion ist es, die für menschliche Infektionen in landwirtschaftlichen Veredelungs- und Verwertungsindustrien verantwortlich zu machen ist. So sind Infektionen unter Arbeitern in Leder- und Wollfabriken bekannt geworden. Auch Erregerübertragungen durch Pack- und Polstermaterial sowie Schafwolle, die durch eingetrocknete Ausscheidungen von Tieren oder durch Zeckenkot verunreinigt waren, wurden beschrieben.

Ein besonderes Infektionsrisiko besteht bei Früh- oder Normalgeburten infizierter Rinder, Schafe und Ziegen, da mit dem Fruchtwasser und der Nachgeburt große Mengen von Coxiiellen ausgeschieden werden. Hierbei sind bei Menschen sowohl aerogene Tröpfcheninfektionen (SCHELLNER 1953) als auch nach Antrocknung der Ausscheidungen Staubinfektionen möglich. Nach SCHLIESSER (1969) kommt der Staubinfektion beim aerogenen Infektionsweg mehr Bedeutung zu als der Tröpfcheninfektion.

Die Übertragung des Q-Fiebers über weite Landstriche durch erregerrhaltigen Staub beschreibt YOUNG (1948). So wurden jährlich in Artesia (Kalifornien) nach dem "Santa Ana"-Wirbelsturm häufig fieberige Erkrankungen beobachtet, die als Q-Fieber diagnostiziert wurden. Eine Epidemie beschreibt BABUDIERI und SUZZI VALLI (1951) aus der Republik San Marino. Als Zeitpunkt für die Infektion ließ sich ein besonders windiger Tag während einer extremen Trockenperiode ermitteln. Wenige Tage später einsetzende Regenfälle stoppten die Infektionen, da sie die Staubbildung verhinderten.

In der Wehrmedizin wurden Staubinfektionen von Q-Fieber beobachtet, wenn militärische Einheiten in Scheunen und Ställen kampierten und dabei auf Stroh, Heu und dem Erdboden schliefen. Gegenüber anderweitig untergebrachten Soldaten traten bei diesen Einheiten gelegentlich epidemieartige Erkrankungen auf, die bis zu 40 % der Truppenstärke betrafen (BABUDIERI 1959).

Aerogene Erregerübertragung durch milchverarbeitende Betriebe wurden aus den USA beschrieben. So wurden in der Nähe von Molkereien und anderen milchwirtschaftlichen Betrieben gehäuft Q-Fieber-Infektionen unter der Wohnbevölkerung beobachtet, die nur durch die Inhalation erregerrhaltigen Staubes erklärbar sind. Staub kann unter günstigen Windverhältnissen weit getragen werden. So weist ARINANTI (1959) darauf hin, daß das Wohnen in der Nähe von milchverarbeitenden Betrieben zur Ausbreitung der Infektion unter der Bevölkerung beitragen

kann. HUEBNER und BELL (1951) fanden in Südkalifornien, daß bei serologischen Untersuchungen größerer Personen-
gruppen 6,9 % der Anwohner im Umkreis einer 3/4 Meile von
Molkereien positiv reagierten, während nur 1,3 % der Unter-
suchten Q-Fieber-Titer aufwiesen, wenn sie außerhalb dieser
Zone wohnten.

Innerhalb des Molkereibetriebes spielt die Aerosolinfection
ebenfalls eine große Rolle. Unter 10 000 untersuchten Per-
sonen fanden HUEBNER und BELL (1951) 23 % positive Q-Fieber-
Titer bei Molkereiarbeitern, im Gegensatz zu 1,4 % einer
keinen tierischen Einflüssen ausgesetzten Kontrollgruppe.

Besondere Bedeutung für die Übertragung des Q-Fiebers auf
den Menschen kommt erfahrungsgemäß auch dem Schlachtvorgang
und den Schlachtprodukten auf Schlachthöfen zu. Ursachen
solcher Ausbrüche liegen teils in Staub-, teils in den
Tröpfchen- oder Aerosolübertragungen bei der Schlachtung
infizierter oder im Haarkleid kontaminierter Kühe und Schafe.
Auch durch das Absprühen des mit Coxiellen verunreinigten
Schlachtplatzes mit scharfem Wasserstrahl wird die Tröpf-
chen- und Aerosolbildung gefördert. ABINANTI (1959) berich-
tet, daß in diesen Tröpfchenaerosolen bis zu 1000 Infektions-
dosen pro Milliliter enthalten sein können. Einzel- und
Gruppenerkrankungen unter Schlachthofarbeitern in Deutsch-
land wurden u. a. von LIEBERMEISTER (1950) in Stuttgart,
MAYER (1949) in Eßlingen, TEUFEL (1968) in Stuttgart sowie
WEISE (1971) in Hamburg beschrieben.

2.1.3. Nachweisverfahren

Der Nachweis von C.b. kann erfolgen:

1. Direkt

- a) durch lichtmikroskopische Darstellung nach Färbung
von Ausstrichen,
- b) durch fluoreszenzmikroskopische Darstellung nach
Färbung mit Auramin oder mit Hilfe der Immuno-
fluoreszenz,
- c) licht- oder fluoreszenzmikroskopisch nach voraus-
r mechanischer Anreicherung,

- d) licht- oder fluoreszenzmikroskopisch nach vorausgegangener Anreicherung durch
Züchtung im embryonierten Hühnerei,
im Tierversuch (Meerschweinchen),
in Gewebekulturen.

2. Indirekt

durch Nachweis spezifischer Antikörper im Serum infizierter Individuen mittels

Komplementbindungsreaktion (KBR)
Agglutination (im Röhrchen)
Kapillar-Agglutination nach LUOTO

- a) Für die einfache lichtmikroskopische Darstellung nach Anfertigung eines Ausstriches von infiziertem oder verdächtigem Untersuchungsmaterial (natürliche Ausscheidungen, Nachgeburtssteile, beimpfte Dottersäcke und Zellkulturen, Organe von Versuchstieren etc.) werden verschiedene Färbungen beschrieben. GIMENEZ (1965) berichtet von streng gram-positivem Verhalten der Coxiellen bei Anwendung von einer von ihm modifizierten Gramfärbung. Er weist darauf hin, daß bei der üblichen Gramfärbung Coxiellen unterschiedliche Reaktionen zeigen können. GIMENEZ stellte Untersuchungen mit 4 verschiedenen Varianten der Gramfärbung an. Als Beize wurde entweder wäßriges Jod oder Äthylalkohol-Jod benutzt. Aus seinen Versuchen ergab sich, daß die Methode D (modifizierte Gram- Kopeloff und Beermanfärbung) das beste Ergebnis erbrachte. Bei der May-Grünwald-Färbung halten Coxiellen nach WEISS und PIETRYK (1956) sowohl Eosin als auch Azur II zurück und zeigen verschiedene Purpurschattierungen.

Bei der MACCHIAVELLO-Färbung ergibt sich ein guter Kontrast zwischen Coxiellen (rot) und Zellelementen (blau), Jedoch entfärben sich die Coxiellen gelegentlich bei der Zitronensäurespülung. Deshalb entwickelte SOTOW (1961) eine neue Färbemethode, bei der zur Färbung eine alkalische Fuchsinlösung, zur Differenzierung Ameisensäure und als

Gegenfärbung Malachitgrün angewendet wird. Hier sind die rot gefärbten Rickettsien auf grünlichem Grund deutlich erkennbar.

Bewährt hat sich auch die Färbung nach STAMP (SCHAAL, 1972). Der Färbung mit Karbolfuchsin folgt ein kurzes Entfärben mit 0,05%iger H_2SO_4 und eine Gegenfärbung mit Malachitgrün.

- b) Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung erfolgt durch die Immunofluoreszenz oder durch die Auraminfärbung.

Der Begriff Fluoreszenz stammt nach WAGNER (1967) von STOKES (1852). Er wird vom Leuchten mancher Flußspatarten (Fluoriten) abgeleitet. Objekte, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, verwandeln die unsichtbaren UV-Strahlen in sichtbares Licht. Als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet man organische Verbindungen, die eine besonders kräftige Luminiszenz zeigen.

Mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurden von URBACH und SPRÖSSIG 1954 die Färbung coxiellenhaltiger Dottersackausstriche durchgeführt. Es zeigte sich, daß Auramin besonders gut zur Fluorochromierung der Coxiellen geeignet und anderen Fluorochromen weit überlegen war. Auramin ist ein wasserlöslicher, hellgelblicher Diphenylmethan-Farbstoff. Zur Färbung werden die lufttrockenen Dottersackausstriche 1 Minute mit Auramin 1 : 500 behandelt (URBACH und SPRÖSSIG 1954). Von RHODE (1973) wird eine anschließende Gegenfärbung mit Eriochromschwarz, 1 : 30 10 sec. lang, empfohlen. Dadurch werden die Zellkonturen besser sichtbar, die Coxiellen nehmen eine leuchtend gelbgrüne Farbe an und heben sich gut vom dunkel gefärbten Hintergrund ab.

Ein spezifisches und damit verbessertes Nachweisverfahren bildet die Immunofluoreszenz. Bei der auf COON (1942) zurückgehenden Technik werden Antikörperproteine an Fluoreszenzfarbstoffe gebunden (konjugiert). Dabei darf die immunologische Spezifität des Antikörpers nicht beeinflußt

- -

werden. Man unterscheidet eine direkte und eine indirekte Immunofluoreszenzmethode (WAGNER 1967). Bei der direkten Methode wird das Antigen durch einen markierten Antikörper sichtbar gemacht. Bei der indirekten Methode verbindet sich zunächst das Antigen mit einem unmarkierten Antikörper (Antiserum). Dieser Komplex wird dann in einem zweiten Schritt durch Zugabe eines spezifisch gegen das Antiserum gerichteten markierten "Anti-Antikörper" dargestellt.

WAGNER empfiehlt zur Markierung der Antikörperproteine von möglichst hochtitrigen Antiseren auszugehen, da ein gewisser Titerverlust nicht zu vermeiden ist. Der gebräuchlichste Fluoreszenzfarbstoff ist nach FEY (1972) das Fluoresceinisothiocyanat (FITC). RHODE (1973) konnte in Coxiellensuspensionen, mit denen er Gewebekulturen beimpfte, in nach STAMP und mit Auramin gefärbten Präparaten Coxiellen bis zu einer Verdünnung des Inokulums von 10^{-8} nachweisen, während sich mit der Immunofluoreszenz auch bei einer Verdünnung von 10^{-9} noch vereinzelte fluoreszierende Coxiellen-Antigene feststellen ließen.

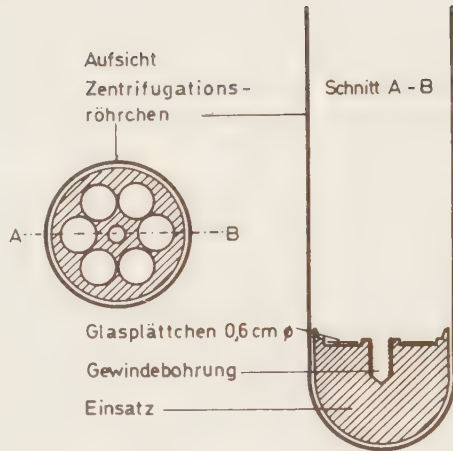
- c) Um in Untersuchungsmaterial bei geringem C.b.-Gehalt den direkten Erregernachweis zu verbessern, kann man versuchen, die Coxiellen mechanisch anzureichern. Dazu hat LEYK eine Plättchenzentrifugationsmethode ausgearbeitet. Hierbei liegen runde Glasplättchen mit einem Durchmesser von 0,6 cm plan auf einem Einsatz, der sich am Boden eines Zentrifugenröhrchens befindet. Aus rickettsienhaltigen Flüssigkeiten erfolgt so durch Zentrifugation eine Anreicherung von Coxiellen auf den Glasplättchen. Diese werden nach Herausnahme gefärbt oder mit Konjugat weiterbehandelt und mittels Immunofluoreszenz untersucht. Durch diese Methode gelang ein direkter mikroskopischer Nachweis von *Coxiella burneti* in Flüssigkeiten bis zu einer Verdünnung von 10^{-12} . Von vergleichend untersuchten mikroskopischen Methoden war der direkte fluoreszenzserolo-

gische Nachweis am besten geeignet. Der Nachweis der Coxiellen gelang zwar auf den Glasplättchen nach der Zentrifugation auch mit der Stamp und Auramin-Eriochromfärbung in gleich hohen Verdünnungen, aber die Fluoreszenzserologie weist den besonderen Vorteil der Spezifität auf. Mit dieser Methode zeichnet sich

auch die Möglichkeit ab, in Luftproben, deren Keimgehalt mit dem Impinger-Verfahren oder mit Gelatinefiltern bestimmt werden soll, das Vorkommen von Rickettsien rasch und sicher festzustellen.

- d) Dem mikroskopischen Direktnachweis von Coxiellen muß häufig eine Züchtung in bebrüteten Hühnereiern oder im Tierversuch vorausgehen.

Als eine gebräuchliche Methode hat sich die Züchtung durch Beimpfung von Dottersäcken embryonierter Hühnereier erwiesen. So beimpfte ORMSBEE et al (1951) Dottersäcke 6 Tage alter embryonierter Hühnereier mit C.b. vom Stamm Nine Mile. Am 3. oder 4. Tag post infektionem waren in den nach MACCHIAVELLO gefärbten Ausstrichen Coxiellen nachweisbar. Bei Untersuchung der beimpften Eier waren immer nur im Dottersack Coxiellen enthalten. In Embryonen und



Schnitt durch das Plättchenzentrifugationsröhrchen
n. LEYK (1972)

verschiedenen außerhalb der Embryos liegenden Geweben wurden Coxiellen nicht gefunden.

ANACKER und Mit. (1964) stellten bei gleicher Färbetechnik am 3. Tag post infektionem ganz vereinzelt Coxiellen fest, wogegen der Gehalt am 5. Tag p. i. stark zunahm und am 7. Tag p. i. nur noch 5,7 % der Embryonen überlebten.

Für den Tierversuch ist das Meerschweinchen das Versuchstier der Wahl. Daneben finden auch die weiße Maus, das Kaninchen und der Hamster Verwendung für die Q-Fieber-Diagnose. Nach intraperitonealer Applikation des Untersuchungsmaterials bei diesen Versuchstieren tritt nach 3 - 9 Tagen Temperaturerhöhung ein. Auf dem Höhepunkt der Erkrankung werden die Tiere getötet. In der pathologisch-anatomisch veränderten Milz lassen sich in Ausstrichen fluoreszenzmikroskopisch Coxiellen nachweisen. Auch die nach einer Infektion einsetzende spezifische Antikörperbildung kann diagnostisch verwertet werden.

C.b. kann experimentell auch in verschiedenen Zellkulturen gezüchtet werden. Als Zellkulturen werden neben Primärkulturen wie Kälberhoden-, Schweinenierenzellen oder Hühnerembryofibroblasten auch Zellstämme wie L-Zellen oder Hela-Zellen verwendet. Nach RHODE (1973) gelingt die Vermehrung am besten in Hühnerembryofibroblasten, in L-Zellen und in den Dottersäcken embryonierter Eizellen.

2.2. Aerosole

Definition

Unter Aerosol versteht man die feinste Verteilung fester oder flüssiger Stoffe in einem Gas (KLIEWE und WASIELEWSKI 1952). Die Schwebeteilchen haben dabei einen Durchmesser von 10^{-8} bis 10^{-3} cm. Das System weist eine gewisse Stabilität auf. Feste Luftbeimengungen werden entweder als "Teilchen" (KLIEWE und WASIELEWSKI 1952, REIFFERSCHIED 1957, 1963), als "Partikel" (ANDERSEN 1958, MAY 1964, LIDWELL und NOBLE 1965) oder auch ganz einfach als "Aerosol" (NÜCKEL 1962 und REIFFERSCHIED 1957) bezeichnet.

Im Hinblick auf lufthygienische Betrachtungen unterscheidet REIFFERSCHIED (1963) das industrielle vom biologischen Aerosol. Unter einem biologischen Aerosol versteht man nicht nur lebende und lebensfähige Anteile, sondern auch Anteile pflanzlicher und tierischer Herkunft. Pilze, Bakterien, Viren und Protozoen, einschließlich ihrer Dauerformen, werden als Teile dieses biologischen Aerosols betrachtet.

Luft, der nach Art und Zahl definierte Bakterien beigemischt wurden, bezeichnet man als Keimaerosole (ALBRECHT 1958, WANNER 1969). Diese werden bevorzugt bei Aerosolkammeruntersuchungen verwandt.

Das natürliche Vorkommen biologischer Aerosole in der freien Natur ist keineswegs selten. Zu bestimmten Jahreszeiten können sich Aerosole von Pilzsporen bilden (CORBAZ 1968). Sporenaerosole von *Micropolyspora faeni* entstehen in gemäßigten Breiten beim Schütteln von ungenügend getrocknetem oder schlecht gelagertem Heu und erzeugen so eine allergische Krankheit beim Menschen (PEPYS und Mitarb. 1963).

Infektiöse bakterielle Aerosole entstehen überall dort, wo zahlreiche Menschen oder Tiere auf engem Raum zusammengedrängt leben. Solche Aerosole sind häufig Folgen der Vermassung in der Zivilisation des Menschen oder in der Intensivhaltung des Tieres. Aerosole dieser Art sind verantwortlich

für die Verbreitung bakterieller Infektionskrankheiten wie Lungentuberkulose, Pneumonien und Milzbrand (WILLIAMS 1967). Infektiöse virale Aerosole spielen besonders bei Erregern respiratorischer Infekte des Menschen (HARPER 1961) oder in der Veterinärmedizin bei der Übertragung des MKS-Virus (CHAMBERLAIN 1970) und des Parainfluenza-3-Virus (KAMINJOLO 1969) eine Rolle.

Auch bei *Coxiella burneti* ist der aerogene Infektionsweg von besonders großer Bedeutung. Nach DERRICK (1961) sollen 90 - 95 % der Q-Fieber-Erkrankungen auf aerogenem Weg, durch Einatmung von Luft, Staub oder feinsten Flüssigkeitströpfchen erfolgen. Eine häufige Quelle von *Coxiella burneti* stellt dabei eingetrockneter und zerstäubter Zeckenkot dar.

Bei der experimentellen Durchführung von Aerosolversuchen mit keimhaltigen Suspensionen werden im Prinzip immer wieder folgende Arbeitsschritte beschrieben:

1. Erzeugung eines Aerosols
2. Rückgewinnung der Keime aus der Luft
3. Nachweis der Keime

2.3. Herstellung künstlicher Aerosole

Die Verfahren, mit denen definierte künstliche Aerosole erzeugt werden können, lassen sich auf 2 Grundarten zurückführen:

- a) das Atomizerverfahren
- b) die Ultraschallvernebelung

a) Der All-glass-atomizer

ist in Abb. 1 dargestellt. Er wird mit 20 - 40 ml Zellsuspension beschickt.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, besteht die eigentliche Zerstäuberdüse aus einem äußeren und einem inneren Mantel. Durch ein kleines Loch am Fuß des äußeren Düsenmantels hat die Zellsuspension Zutritt zum Raum zwischen den beiden Düsenmänteln. Durch den Sog, welchen die mit hoher Geschwindigkeit austretende Luft erzeugt, wird die Testflüssigkeit im Zwischenraum angeho-

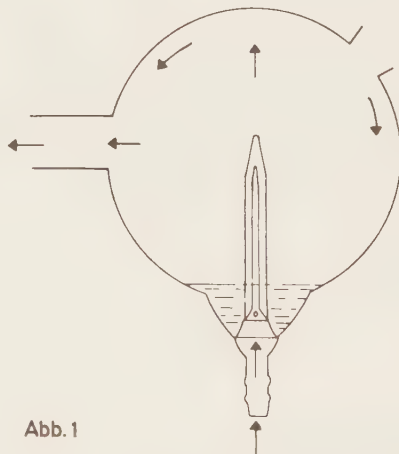


Abb.1

Schema des all-glass atomizers

ben und gelangt so vor die eigentliche Düsenmündung, wo sie zerstäubt wird. Mit Vehemenz werden die erzeugten Flüssigkeitströpfchen ins Zentrum der Glaskugel geschleudert. Ein Teil der Tröpfchen prallt an der oberen

Glaswandung an, kondensiert zu größeren Tropfen und fließt ins Flüssigkeitsreservoir zurück (reflux-Process) (FEY 1970). Die feineren unter den gebildeten Tröpfchen werden mit der abstreichenden Luft als feines Aerosol, bestehend aus Tröpfchen von 5 - 15 μm Durchmesser, den Atomizer verlassen. Der Flüssigkeitsumsatz beträgt dabei ca. 2,5 ml/10 min.

b) Der De Vilbiss-Ultraschallvernebler

erzeugt durch einen piezo-elektrischen Transduktor Schwingungen von 1350 KHz in einem Wasserbad. Diese Schwingungen übertragen sich auf eine Kunststoffmembran der Vernebelungscuvette, in der sich die Keimsuspension befindet (siehe Abb. 2). Dadurch wird die Flüssigkeit in der Vernebelungskammer ebenfalls zum Schwingen angeregt. Bei einer kritischen Höhe der Amplitude werden auf den Wellenbergen kleine Tröpfchen abgeschleudert, die mit der Luftstrom als feindisperses Aerosol abgehen (zit. n. FEY, 1970).

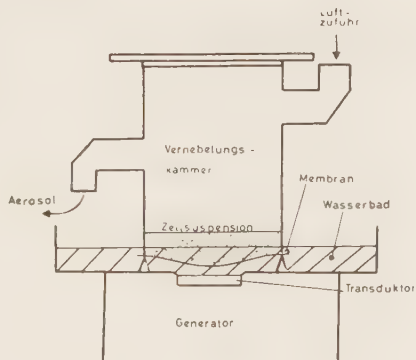


Abb. 2

De Vilbiss - Ultraschallvernebler
(FEY)

Im Vergleich zum All-glass-atomizer besitzt das Ultraschallgerät eine wesentlich höhere Umsatzleistung. Dabei

sind die erzeugten Aerosole bezüglich Tröpfchengröße sehr uniform. Beim Ultraschallvernebler werden aber im Gegensatz zum All-glass-atomizer während des Verneblungsprozesses 30 % der vermehrungsfähigen Zellen inaktiviert (FEY 1970).

2.4. Rückgewinnung der Keime aus der Luft

Nach GUNDERMANN (1969) lassen sich die Methoden der Keimrückgewinnung folgendermaßen einteilen:

- a) Impingerverfahren (Waschprinzip)
- b) Schlitzsammler (Trägheitsprinzip)
- c) Filtrationsmethoden (Filterprinzip)

a) Impingerverfahren

Die Bezeichnung

"Impinger" kommt aus dem Englischen, to impinge = stoßen, prallen. Ein Impinger besteht aus einer Waschflasche (siehe Abb. 3), in die ein, in eine Kapillare auslaufendes Glasrohr hineinreicht. Wird Luft aus der Waschflasche über das Absaugrohr gesaugt, kommt es zu einer Luftaspiration über das Glasrohr und damit über die Kapillare. In dieser Kapillare wird der Luftstrom mit den Keimen auf etwa 80 % der Schallgeschwindigkeit beschleunigt. Infolge

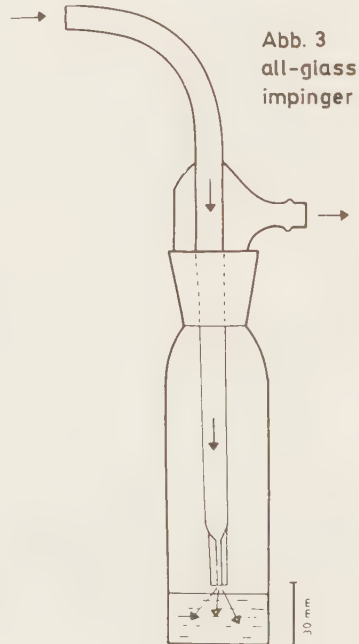


Abb. 3
all-glass
impinger

der Trägheit der Keime verlassen diese die Kapillare geradlinig und werden mit hoher Wahrscheinlichkeit in eine Sammel Flüssigkeit eingeschossen. Die Anzahl der lebensfähigen Keime kann man nun durch Ausspateln auf festem Nährboden und Auszählen der Kolonien, oder durch Anfärben mit Fluorochromen und anschließendem mikroskopischem Auszählen ermitteln.

TYLER und SHIPS (1959) entwickelten den All-glass-Immpinger AGI - 4, der eine Modifikation des von HEN. ERSON (1952) beschriebenen Portonimpingers ist. Dieser AGI-4 erhielt seinen Namen deswegen, weil sich sein Kapillarende 4 mm über dem Gefäßboden befindet. Bei einer Durchflußrate von 12,5 l/min tritt an der Kapillaraustrittsöffnung eine Luftgeschwindigkeit von 270m/sec auf (80 % der Schallgeschwindigkeit 333 m/sec). Eine Weiterentwicklung des AGI-4 beschreiben WOLF und Mit. 1959 sowie BRACHMANN und Mit. 1964. BRACHMANN und Mit. bezeichnen dieses Gerät als AGI-30, da der Abstand der Kapillare vom Flaschenboden auf 30 mm vergrößert ist. Der All-glass-impinger AGI-30 ist von den Teilnehmern des ersten Internationalen Symposiums für Aerobiologie 1963 zum Standardsampler und Referenzgerät erhoben worden.

Eine Übersicht über die Entwicklung der Impinger gibt FALKOWSKI (1967).

b) Schlitzsampler

Bei Schlitzsamplern wird die angesaugte Luft über einen Schlitz direkt auf das Agarplate geleitet. Durch die Beschleunigung des Luftstromes treten die Keime aus dem Luftstrom aus, stoßen auf die Agarplatte und haften an ihr.

Eine Modifikation der Weiterentwicklung ist in der mehrstöckigen, von ANDERSON 1958 beschriebenen und nach ihm benannten "multiple-slit sampler" zu sehen. Dieser Sammler ist ein Schlitzsampler mit sechs Stufen. Jede Stape

besteht aus einer mit 400 Löchern perforierten dünnen Aluminiumplatte und einem darunter befindlichen Raum für die Aufnahme von je einer nicht beweglichen Petrischale. Die sechs Etagen werden unter Verwendung von Dichtungsringen übereinandergesetzt und durch 3 Klemmfedern zusammengehalten. Am Fußteil des Gerätes befindet sich ein Stutzen zum Anschluß der Luftsaugpumpe. Die Zuführung der zu prüfenden Luft erfolgt von oben durch einen kegelförmigen Deckel, der an seiner Spitze eine Einströmöffnung freiläßt. Die

Luft wird mit einem Umsatz von 28,4 l/min angesaugt. Die Größe der Löcher in den Aluminiumplatten ist für jede Stufe einheitlich, die Anzahl verringert sich von Stufe zu Stufe. Dadurch verstärkt sich die Strahlgeschwindigkeit nach aerodynamischen Gesetzmäßigkeiten von der 1. Stufe bis auf das 22-fache in der 6. Stufe. Ist die einem Keim erteilte Geschwindigkeit ausreichend groß, so kann nach ANDERSEN (1958) die Trägheit des Keimes den aerodynamischen Sog überwinden und den abdrehenden Luftstrahl verlassen. Der Keim stößt auf die Nährbodenoberfläche. Das Gerät ist so konstruiert, daß bei der genannten Umsatzrate eine Gliederung von Aerosolpartikel im Bereich von 1 - 10 μ Größe erreicht wird.

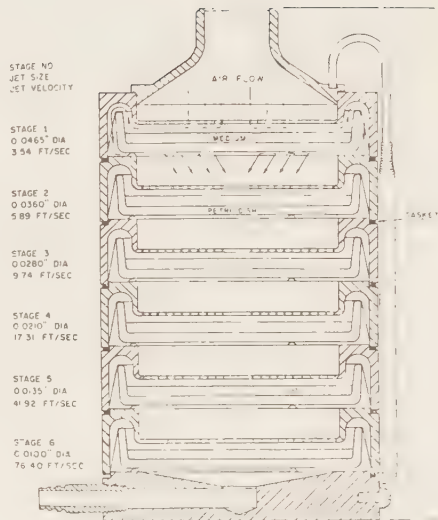


Abb.4 Andersen-Schlitzsammler
(ANDERSEN, 1958)

c) Filtrationsverfahren

Bei der Filtrationstechnik finden folgende 2 Filterarten Anwendung:

Membranfilter,
Gelatinefilter.

Die Filter werden für die Luftfiltration in Filterhalter eingespannt und nach dem Filtrationsvorgang verschieden weiterbehandelt.

Die Membranfilter bestehen aus wasserunlöslichen Celluloseestern oder einem wasserreichen Gel von Aluminium-alginat (SCHYMA, 1961). Nach KRUSE (1948) werden die wasserunlöslichen Celluloseesterfilter im Anschluß an den Saugvorgang ohne jede weitere Behandlung unmittelbar auf feste Nährböden aufgelegt und bis zur Entstehung makroskopisch erkennbarer Kolonien bebrütet.

Neben dieser Auswertmethode gibt es noch den direkten mikroskopischen Nachweis durch Anfärben nicht fluoreszierender Membranfilter. Da solche Filtertypen jedoch nicht transparent gemacht werden können, benötigt man zur Auswertung ein Auflichtfluoreszenzmikroskop.

Die Membranfilter bringen verschiedene Nachteile mit sich, so fehlt die Möglichkeit der Verdünnung, sodaß bei zu hohen Keimdichten auf Nährböden Rasenbildung auftritt (PETERS 1967) und somit keine quantitative Aussage gemacht werden kann. Weiter ist bei Membranfiltern die Gefahr einer Austrocknung und damit eine negative Beeinflussung der Vermehrungsfähigkeit der Keime auf der Membranfilteroberfläche gegeben (MAIER und VOGGEL, 1965).

Diese Nachteile bestehen bei den wasserlöslichen Gelatinefiltern nicht. 1949 wurde erstmals ein solches Verfahren beschrieben, bei dem Bakterien aus der Luft auf wasserlöslichen Filtern aus Gelatineschau abgedrückt wurden (MITOULI et al. 1949). Anfangs handelte es sich um 13 mm dicke, sogen. "Gelatineschauziegel", die, durch besondere

Behandlung in die Form eines "Derby-Hutes" gebracht und in eine geeignete Apparatur eingespannt, zur Filtration von Luft verwendet wurden (MITCHELL et al. 1954). Diese Filter werden 72 Stunden lang mit "Carboxylgas" sterilisiert (10 % Äthylenoxyd, 90 % Kohlendioxyd) und nach Exposition für die kulturelle Keimzahlbestimmung in wässrigen Medien aufgelöst. Davon kann man dann beliebige Verdünnungsstufen zur genauen quantitativen Auswertung herstellen (MITCHELL 1954).

Die heute im Handel befindlichen Gelatinefilter der Firma Sartorius (Membranfilter AG, Göttingen) sind dünne weiße Scheiben aus trockenem, wasserlöslichem Gelatineschaum. Sie haben einen Durchmesser von 50 mm, eine Schichtdicke von 250 μm und ein Hohlraumvolumen von 80 - 85 % (MAIER und VOGGEL 1965). Die Durchlässigkeit soll nach Angaben der Herstellerfirma bei einer Druckdifferenz von 500 mm Wassersäule 2,7 Liter Luft/min/cm² betragen. Dies entspricht bei einer wirksamen Filtrationsfläche von 16 cm² einer Proben-Größe von 0,72 l/sec oder 2,6 m³/h (ROTTER und KOLLER 1973). Diese hohe Permeabilität ist in der großen Porenzahl pro cm² Filterfläche begründet. Der mittlere Porendurchmesser beträgt 1 - 3 μm (MAIER und VOGGEL 1965). Sterilisiert werden diese Filter mit Gammastrahlen, da sich die früher übliche Äthylenoxydsterilisation als nachteilig auf die Haltbarkeit und das Lösungsvermögen erwiesen hat (NOLLER und SPENDLOVE 1956, PETRAS 1966, SCHRÖDER 1968).

Zur Anwendung wird die keimhaltige Luft durch das in der Einspannvorrichtung gehaltene Gelatinefilter gesaugt. Nach der Filtration wird das Filter unter sterilen Bedingungen in einer abgemessenen Menge steriler physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Zur Beschleunigung der Auflösung kann die Suspension 20 - 30 Min. bei + 30 °C - 35 °C im Wasserbad unter mehrmaligem Schütteln erwärmt werden. Der Nachweis der Keime in dem gelösten Gelatinefilter kann

kulturell quantitativ und qualitativ, per Ausstrich auf dem Objektivträger mit Anfärbung oder durch Verimpfung im Tierversuch erfolgen.

2.5. Leistungsvergleich zwischen verschiedenen Keimsammelverfahren

Die in der Literatur beschriebenen Leistungsangaben der Keimsammelgeräte zeigen recht unterschiedliche Ergebnisse. So verglich MITCHELL (1954) die Leistung der Gelatinefilter mit der anderer, nicht näher beschriebener Sammelgeräte. Es zeigte sich, daß das Gelatinefilter in seiner Keimausbeute den 3 verschiedenen Impingern um das 2,5 - 7fache überlegen war. NOLLER und SPENDLOVE (1956) bescheinigten den Gelatinefiltern eine den Impingern gleichwertige Wirksamkeit bei der Filtration von Sporen, fanden jedoch eine geringere Wirksamkeit bei der Filtration von vegetativen Mikroorganismen (*Serratia marcescens*), weil diese empfindlichen Keime wahrscheinlich beim Aufprall auf die Filteroberfläche geschädigt wurden. Dies bestätigten auch MAIER und VOGGEL 1965. Sie stellten vergleichende Untersuchungen zwischen Gelatinefiltern, Membranfiltern und einem nicht näher gekennzeichnetem Impinger an. Die Ergebnisse zwischen Impinger und Gelatinefilter waren fast gleich. Demgegenüber lagen die Keimzahlen auf Membranfiltern erheblich niedriger.

PETRAS (1966) bestätigte die Erfahrungen von NOLLER und SPENDLOVE insofern, als auch er fand, daß empfindliche Bakterien wie *Serratia marcescens* während des Filtrationsvorganges schnell ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren, so daß die Ausbeute des Gelatinefilterverfahrens nur 8,8 % der Ausbeute des Standardimpingers erreichte. Bei Keimen mit langer Überlebensrate, wie z. B. *subtilis*, war das Gelatinefilterverfahren dem Impingerverfahren dagegen überlegen.

Auch KUKLENIE (1967) arbeitete mit Gelatinefiltern der Firma Sartorius, Membranfilter GmbH, Osttingen. KUKLENIE nahm Proben aus Tierstallungen. Er fand bei 24 Versuchen im Mittel aller Ställe mit dem Gelatinefilter 58 % der

Ausbeute des Standardimpingers, speziell im Hühnerstall 45,5 %. Bei KEMPMANN (1970) erreichte das Gelatinefilterverfahren eine Keimausbeute von ca. 81 - 92 % des Standard-Impinger-Verfahrens.

HILLIGER (1969) verglich den Casella-Schlitzsammler mit dem Standardimpinger. Der Schlitzsammler führte gegenüber dem Standard-Impinger zu einer Keimausbeute, die zwischen 24 - 27 % lag.

EHRLICH (1972) wies eine Leistung von 50 % für einen Schlitzsammler nach.

HILBIG (1972) verglich den Andersen-Sampler mit dem Standard-Impinger und stellte nur eine Leistung von 37,3 % gegenüber dem Impinger fest.

Aus Tabelle 1 sind die Leistungsunterschiede der einzelnen Nachweismethoden ersichtlich.

Untersuchungsverfahren

Autor, Jahr und Untersuchungsort	Standard-Impinger	andere Impinger	Gelatinefilter	Membranfilter	Schlitzsammler
MITCHELL 1954 Ort nicht gen.		100 % 100 % 100 %	263 % 535 % 696 %		
HOLLER und SPANDLOVE 1956 Aerosolkammer (G. globigii)		100 %	92,1 % 102,6 %		
MAIER und VOGGEL 1965 Labor		100 %	96 %	1,6 %	
PETRAS 1966 Aerosolkammer (B. subtilis) (S.marcescens)	100 % 100 %		114,8 % 8,8 %		
MURTHENKE 1967 Hühnerstall Kuhstall Schweinestall Mäusezuchtst.	100 % 100 % 100 % 100 %		45,5 % 53,0 % 69,0 % 64,5 % 58,0 %	- 25,7 % 44,7 % 50,7 % 43,2 %	
KEMPMANN, M. 1970 Legehennenstall	100 %		81 - 92 %		
HILLIGER 1969 Meerschweinchenzuchtanstalt	100 %				24 und 27 %
ERLICH, R. 1965 S. marcescens B. subtilis	100 %				50 %
HILBIG, V. 1972 Meerschweinchenstall	100 %				37,3 I Andersen- J.

Tab. 1: Leistungsvergleiche bei Luftkeimuntersuchungen
(ergänzt nach Kempmann 1970)

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

3.1.1. Verneblungssuspensionen

Für die methodischen Vorversuche fand *Serratia marcescens* Verwendung. Dieser Keim bildet beim Kultivieren das rote *Serratia*-Pigment Prodigiosin und ist dadurch leicht zu erkennen und auszuzählen. Bei meiner *Serratia*suspension wurde eine Ausgangskeimzahl von etwa 10^{11} /ml ermittelt. Kultiviert wurde der Keim auf Nutrient Broth Agar folgender Rezeptur:

pro Liter Lösung
8 g Nutrient Broth (Difco)
4 g NaCl
5 g Glucose
15 g Agar

Für die Hauptversuche wurden FRIGEN-gereinigte Dottersack-suspensionen von *Coxiella burnetii* der 12. Eipassage des Stammes Henzlerling verwendet. In den Ausgangssuspensionen wurden $1,4 \times 10^8$ Coxiellen im ml errechnet.

3.1.2. Vernebler

Zur Aerosolherstellung wurde der Vernebler des "Pari Inhalationsgerätes Standard 088" der Paul Ritzau Pari Werk KG, Starnberg, verwendet. Dieses Gerät dient der Inhalationstherapie. Der Aufbau des Verneblers ist aus der Abb. 5 zu ersehen. Die Arbeitsweise gleicht im Prinzip der des vorher beschriebenen Atomizerverfahrens.

Die Verneblungssuspension wird nach vorherigem Abschrauben der Verneblerkuppel in den Suspensionsbecher gefüllt. Das Arbeitsprinzip des Verneblers ist folgendes:

Aus der Düse austretende Druckluft saugt die Keimsuspension über 2 am Fuß der Düse befindliche Bohrungen durch 2 Kanäle an, und befördert so das Aerosolmaterial gegen ein Prallblech, wodurch eine intensive Verneblung erfolgen kann.

Das Aerosol verläßt über die Verneblerkuppel das Gerät. Betrieben wurde der Vernebler mit einer Leybold "mini"-Pumpe des Typs ADMS 56 M4 Y17. In Verbindung mit dieser Pumpe wurde ein Keimsuspensionsumsatz des Verneblers von 0,27 ml in der Minute erzielt. Der Luftumsatz betrug dabei 14 l/min. Die mit diesem Atomizer erzielten Teilchengrößen betrugen nach Werksangaben 0,5 - 5,5 μm .

Fremdkeimbeimischungen beim Aerosolieren verhinderte eine am Fuß des Handgriffes befindliche Filtereinlage.

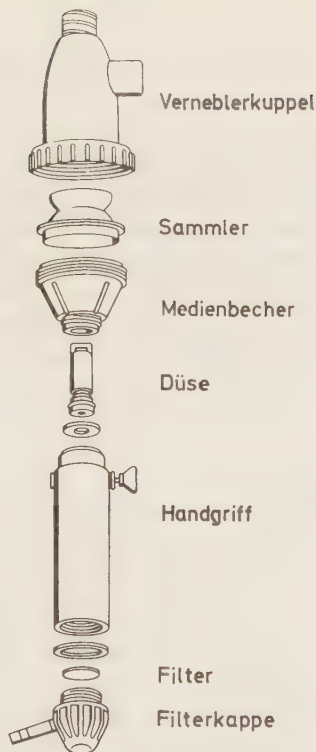


Abb.5 Pari-Vernebler (RITZAU)

3.1.3. Aerosolrückgewinnung

a) Gelatinefilter

Für die Versuche wurden Gelatinefilter des Typs SM 12 602 der Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen, verwendet. Diese Filter haben echte Membranstruktur mit einer Porengröße von 3 μm (gemessen nach dem Quecksilberintrusionsverfahren) und einer Schichtdicke von 130 - 150 μm . Das Hohlraumvolumen beträgt 80 - 85 %. Sie sind speziell für die Luftkeimbestimmung entwickelt worden. Diese Gelatinefilter lassen sich in destilliertem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder in Nährbouillon vollständig auflösen. Zur Gebrauch wurden die Filter in die Einspannvorrichtung

SM 16599 der Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen, eingespannt. Diese Einspannvorrichtung besteht aus einem Unterteil mit Luerstutzen und fixierter Lochplatte als Filterunterstützung und einem aufschraubbaren Oberteil der offenen Form mit Dichtungsring. Der Filterhalter besteht aus Polycarbonat (Makrolon der Farbenfabriken Bayer AG) und ist mit trockener Heißluft sterilisierbar. Die wirksame Filtrationsfläche des eingespannten Filters beträgt $12,5 \text{ cm}^2$. In Verbindung mit der Leybold "mini"-Pumpe des Typs ADES 56 N4 Y17 und dem später beschriebenen Versuchsaufbau ergab sich eine Luftdurchlässigkeit des Filters von 14 l/min.

b) Impinger

Als Impinger wurde eine handelsübliche Waschflasche so geändert, daß die wichtigsten Maße dem von BRACHMAN und Mit. 1964 empfohlenen Standardimpinger entsprachen (siehe Abb. 4).

Der Glas-Impinger hat eine Höhe von 27 cm, einen Außendurchmesser von 5,5 cm. Die Luft tritt durch ein am Ansaugende rechtwinkelig abgebogenes Glasrohr, das einen Innendurchmesser von 5 mm hat, senkrecht in das Gefäß ein. Das Glasrohr läuft in einer Kapillare von 1 mm Durchmesser aus und endet 30 mm über dem Flaschenboden. Abgesaugt wird die Luft aus der Flasche aus einem Stutzen, der sich am oberen Ende der Flasche befindet.

Die Auffangflüssigkeit wurde nach einem Rezept von TYLER und SHIPE (1959) zusammengestellt:

pro Liter Aqua dest.

2 g Gelatine

4 g Na_2HPO_4

Die Menge der Auffangflüssigkeit betrug bei allen Versuchen konstant 30 ml.

Bei Verwendung der gleichen Pumpe und des gleichen Versuchsaufbaues wie beim Gelatinefilter wurde eine Luftansaugleistung von 12 l/min. erreicht.

3.2. Methode

3.2.1. Versuchsaufbau

Alle Aerosolversuche wurden in einer "glove-box" mit einem Volumen von $0,5 \text{ m}^3$ durchgeführt. In die vordere Front sind 2 Handschuhhalterungen und 2 Beobachtungsfenster eingebaut, die Oberseite besteht aus Glas. Im rechten und linken Seitenteil befinden sich je 3 Öffnungen, die durch Gummistopfen verschlossen sind. Die Gummistopfen können nach Bedarf durchbohrt werden und dienen dem Durchtritt der Zu- und Ableitungen für die Druck- und Saugluft.

Der schematische Versuchsaufbau in der Aerosolkammer ist in Abb. 6 wiedergegeben.

In der Kammer wurde der Vernebler an der linken Seitenwand fest eingebaut. Er stand über einen Druckschlauch mit der außerhalb stehenden Druckpumpe in Verbindung. Die ebenfalls außerhalb der Kammer befindliche Saugpumpe stand über eine Druckleitung mit dem Waschflaschen-Impinger- oder dem Waschflaschen-Gelatinefiltersystem in Verbindung.

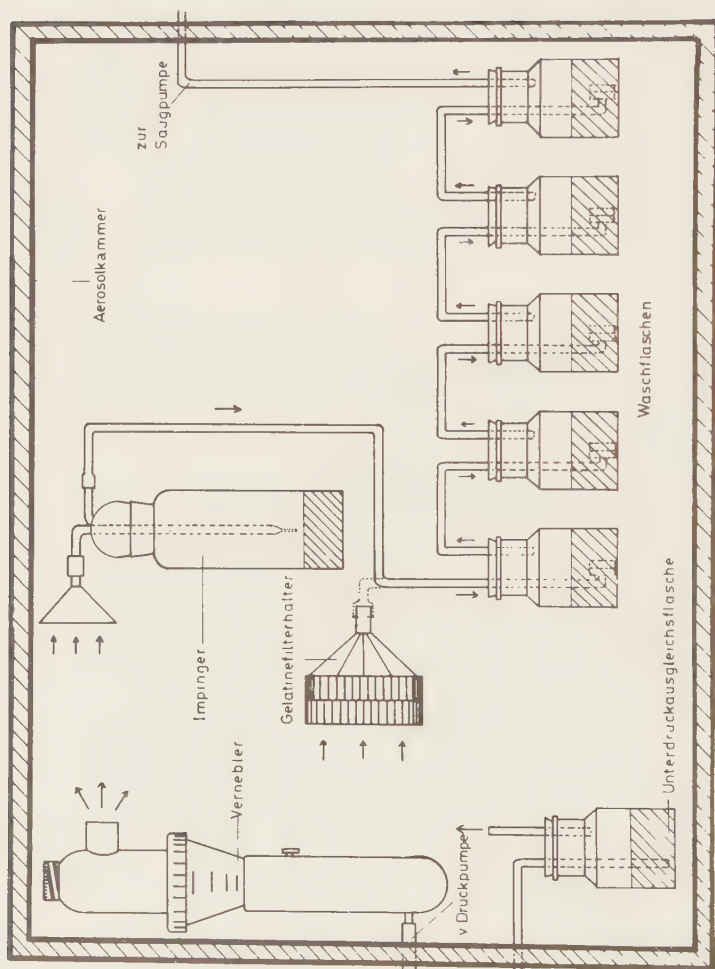
Durch fünf in Reihe geschaltete Waschflaschen wurde die vom Impinger oder vom Gelatinefilter kommende Luft in Waschflüssigkeiten geleitet, um eventuell die Filterpassierende Coxiellen mit Sicherheit zurückzuhalten. Bei diesem Waschvorgang wurde ein Perleffekt durch modifizierte Swinnex-Filterhalter erreicht, die am Ende der eingetauchten Glaszuleitungen befestigt wurden. Als Waschflüssigkeit diente 2%ige Peressigsäure.

Impinger oder Gelatinefilter konnten wahlweise vor das Waschflaschensystem geschaltet werden.

Eine gesonderte angebrachte Waschflasche diente dem Druckausgleich in der Aerosolkammer.

Abb. 6

Schematischer Versuchsaufbau zu den Aerosolversuchen



3.2.2. Herstellung der Keimsuspensionen und Aerosolierung

a) Serratia marcescens

Serratia marcescens (S.m.) wurde auf Nutrient Broth Agar mit 0,5 % Glucosezusatz (NBA + G) kultiviert. Nach einer Bebrütungszeit von einem Tag und anschließend eintägigen Stehenlassens der Platten bei Zimmertemperatur wurden die rot gefärbten Kolonien mit 5 ml physiologischer NaCl und 7%igem meso-Inositzusatz pro Petrischale aufgeschwemmt. Nach PETRAS (1966) wird durch den meso-Inositzusatz der Austrocknungseffekt beim Vernebeln gehemmt und damit die Überlebensfähigkeit von S.m. gefördert. Von der so gewonnenen Keimsuspension wurde ein Teil zur Keimzahlbestimmung herangezogen und der andere Teil in den Vernebler gefüllt. Die Keimzahlbestimmung erfolgte in der Art, daß von der Ausgangssuspension eine 10er Verdünnungsreihe mit phys. NaCl angesetzt wurde. Von jeder Verdünnungsstufe wurde ein definierter Tropfen (0,025 ml) auf NBA + G - Agar ausgespatelt. Nach 24-stündigem Bebrüten wurden mittels des Placont-Gerätes der Fa. Boskamp die Kolonien der Platten ausgezählt, in denen die einzelnen Kolonien klar voneinander abtrennbar waren und ihre Anzahl weniger als 300 betrug. Aus der Anzahl der Kolonien wurde der Keimgehalt der Verneblerflüssigkeit ermittelt. Vernebelt wurde die Suspension während der gesamten definierten Dauer des Absaugvorganges des Impingers oder des Gelatinefilters. Die Zahl der tatsächlich vernebelten Keime ergab sich aus folgender Berechnung:

Der Vernebler setzt während der 2-Minuten-Gelatinefiltertätigkeit 0,54 ml Keimsuspension um. Da der Keimgehalt pro ml aus der vorherigen Bestimmung bekannt ist, kann damit auch der Umsatz der vernebelten Keime ermittelt werden.

b) Coxiella burneti

Die in einer Suspension vorliegenden, mit 0,4 % Formalin

inaktivierten, Coxiellen wurden nach dem gleichen Prinzip vernebelt, wie dies mit S.m. geschah. Die Anzahl der Verneblungskeime wurde nach der Methode von PRESCOTT-BREED ermittelt, da sich *Coxiella burneti* nicht auf Nährböden vermehrt. Dazu wurde 0,01 ml der Suspension auf einer vorher markierten Fläche von 1 cm² auf einem Objektträger ausgestrichen, hitzefixiert und mit Auramin angefärbt. Dann wurden die Keime in 20 Gesichtsfeldern (jeweils 0,14 mm Ø) ausgezählt. Über die Multiplikation dieser ermittelten Zahl mit dem Faktor 600 000 erhält man die Zahl der Keime pro ml. Falls die Suspension zu dicht war, wurde zuerst eine Verdünnungsreihe ausstitriert und die Verdünnungsstufe ausgewertet, in der die Keime zählbar waren. Vernebelt wurden jeweils Verdünnungsstufen von 10⁸/ml bis zu 10³/ml.

3.2.3. Aerosolrückgewinnung

Da der Impinger und das Gelatinefilter verschiedene Luftdurchflußmengen in der Minute aufwiesen, mußten diese beiden Systeme aufeinander abgestimmt werden. Das Gelatinefilter hatte bei einer Absaugzeit von zwei Minuten einen Luftdurchsatz von 28 l. Um mit dem Impinger ebenfalls 28 l absaugen zu können, mußte dieser 2 Minuten und 20 Sekunden arbeiten. Es ergaben sich also für alle Versuche folgende Arbeitszeiten:

Gelatinefilter:	2 min	für 28 l Luft
Impinger	: 2 min 20 sec	für 28 l Luft

Die Durchführung der Rückgewinnung erfolgte in der Art, daß das Gelatinefilter oder der Impinger für den Absaugvorgang jeweils 30 cm vor das Aerosolgerät am gleichen Ort in der Kammer aufgestellt wurden. Vor den Versuchen wurden jeweils der Impinger fest vor die Waschflaschenkette angeschlossen und der Gelatinefilterhalter mit eingespanntem Gelatinefilter abgedeckt, und vor der Coxiellensidimentation geschützt, neben den Impinger gelegt. Bei laufendem

Versuch war so ein schneller Wechsel vom Impinger auf das Filter möglich.

Nach dem Absaugvorgang wurde das ganze System abgeschaltet und der Impinger und das Gelatinefilter, die jeweils die gleiche Versuchsnummer bekamen, zur weiteren Verarbeitung aus der Aerosolkammer entnommen.

3.2.4. Nachweisverfahren

3.2.4.1. Serratia marcescens

Das nach dem Absaugvorgang entnommene Gelatinefilter wurde in 30 ml phys. NaCl gelöst. Der Lösungsvorgang (Dauer 1 - 2 Min.) wurde durch leichtes Erwärmen unter Schütteln beschleunigt.

Von dieser Ausgangslösung wurde eine 10er Verdünnungsreihe bis 10^{-10} angefertigt und die Zahl der Keime im Plattenverdünnungstest wie unter 3.2.2.a bestimmt. So konnte die Anzahl der Keime pro Tropfen (0,025 ml) bzw. pro ml errechnet werden. Da die tatsächliche Zahl der zurückgewonnenen Keime beim Impinger- und beim Gelatinefilterverfahren jeweils in 30 ml gelöst waren, wurde dieser Faktor 30 bei der Berechnung mitberücksichtigt.

3.2.4.2. Coxiella burneti

Die in den 30 ml Impinger- oder in 30 ml Gelatinefilterflüssigkeit gelösten Coxiellen wurden durch folgende Verfahren qualitativ und quantitativ nachgewiesen und gezählt:

- a) Direkte lichtmikroskopische Darstellung in nach STAMP gefärbten Ausstrichen und Auszählung nach PRESCOTT-BREED.
- b) Direkte fluoreszenzmikroskopische Darstellung nach Färbung mit Auramin oder mit Hilfe der Immunofluoreszenz und Auszählung nach PRESCOTT-BREED.
- c) Direkte fluoreszenzmikroskopische Darstellung nach Färbung mit Auramin oder mit Hilfe der Immunofluoreszenz nach vorausgegangener mechanischer Anreicherung (Pelletierung oder Plattenzentrifugation).

Zu a:

Auf einem Objektträger wurde ein 1 cm^2 großes Feld mit einem Diamantschreiber eingekratzt. In diesem Feld wurde 0,01 ml der zu untersuchenden Coxiellensuspension ausgestrichen, hitzefixiert und nach STAMP (SCHAAL, 1972) in der Art gefärbt, daß einer 5-minütigen Färbung mit Karbol-fuchsin ein 10 Sekunden langes Entfärben mit 0,05%iger H_2SO_4 -Lösung folgte. Anschließend wurde 30 Sekunden mit Malachitgrün gegengefärbt.

Bei 1000-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (Ölimmersion) wurden die rot angefärbten Coxiellen in bis zu 80 Blickfeldern pro Objektträger ausgezählt. Die pro 1 Blickfeld ermittelte durchschnittliche Zahl ergab mit dem Faktor 600 000 multipliziert, die Keimzahl pro ml. Um die absolut zurückgewonnene Coxiellenzahl in der gesamten Impinger- bzw. Gelatinefilterflüssigkeit zu errechnen, mußte diese Keimzahl noch mit dem Faktor 30 multipliziert werden.

Zu b:

Auf einem, wie bei der STAMP-Färbung präparierten Objektträger wurde Untersuchungsmaterial ausgestrichen, hitzefixiert und mit Auramin gefärbt (URBACH und SPRÖSSIG 1954). Dazu wurde das Präparat 3 Minuten mit Auraminlösung 1 : 750 behandelt, danach mit Wasser gespült und mit Eriochromschwarz 1 : 30 kurz gegengefärbt (LEYK 1972).

Für die fluoreszenzserologische Untersuchung nach FEY (1971) wurden die Objektträger ebenfalls genauso vorbereitet wie unter a) beschrieben. Hier erfolgte jedoch die Fixierung der lufttrockenen Präparate für 10 Minuten in Aceton bei $- 30^\circ\text{C}$. Danach wurden die Ausstriche mit konjugiertem Coxiellenantiserum in Gebrauchsverdünnung überschichtet und für 60 Minuten in eine feuchte Kammer gestellt. Anschließend wurden die Objektträger 2mal vorsichtig mit PBS (pH 8,0) gespült, um das nicht gebundene Konjugat zu entfernen, dann schonend getrocknet und mit einem Deck-

gläschen versehen. als Mikroskop fand das Leitz-Fluoreszenzmikroskop Ortholux (Beleuchtung: Philips-Quecksilberdampflampe, Filter Blau BG 12, BG 38 und K 490) Verwendung (Auflichtfluoreszenz).

Die qualitative und quantitative Beurteilung der auramin- und fluoreszenzserologisch gefärbten Präparate erfolgte in der gleichen Art, wie bei der STAMP-Färbung beschrieben.

Zu c:

Die mechanische Anreicherung der Coxiellen in der Impingerflüssigkeit oder in den gelösten Gelatinefiltern wurde nach 2 Verfahren vorgenommen. Das 1. Verfahren bestand in der Herstellung eines Coxiellenpellets, wozu 15 ml des Untersuchungsmaterials bei 10 000 U/min für 1 Stunde in einer Phywe-Zentrifuge mit Winkelrotor zentrifugiert wurden. Danach wurde der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt und das Sediment in den verbleibenden 0,5 ml Flüssigkeit resuspendiert. Dieses "Konzentrat" wurde dann nach der unter der STAMP-Färbung beschriebenen PRESCOTT-BREED-Methode in Verbindung mit der Auraminfärbung und der Immunofluoreszenz quantitativ ausgewertet und auf die Gesamtmenge an Impinger- bzw. Gelatinefilterflüssigkeit von 30 ml umgerechnet.

Als 2. Methode der mechanischen Anreicherung wurde die Flättchenzentrifugation nach LEYK (1972) angewendet. Hier wurde der mit den Glasplättchen gefüllte Einsatz in die speziellen Zentrifugenröhrchen gegeben (siehe Seite 9) und dann vorsichtig mit 15 ml der Untersuchungssuspension überschichtet. Zu beachten war, daß die Einsatzebene stets genau senkrecht zur Zentrifugationsebene eingestellt war. Dies konnte dadurch erreicht werden, daß ein langer Born, an dessen Ende sich ein Gewinde befand, in die Einsatzbohrung gedreht wurde und damit der Einsatz justiert wurde. Zentrifugiert wurde dann bei 5000 U/min für 2 Stunden mittels einer Christ-Zentrifuge

mit Schwingrotor. Nach der Zentrifugation wurde der gesamte Überstand vorsichtig, damit keine Resuspendierung stattfand, über eine Wasserstrahlpumpe mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Der Einsatz wurde mittels des Gewindedornes entnommen und die Glasplättchen mit einer spitzen Pinzette aus dem Einsatz entfernt, ganz leicht hitzefixiert und dann mittels Caedax (synthetischer Kanadabalsam) auf Objektträger gekittet. In diesem Zustand war ein leichtes Färben der kleinen Glasplättchen durch Auramin oder eine Überschichtung durch konjugiertes Antiserum möglich. Die quantitative Auswertung der Glasplättchen unter dem vorner genannten Leitz-Aufflichtfluoreszenzmikroskop erfolgte bei einer 1000fachen Vergrößerung. Die Fläche des Gesichtsfeldes betrug $0,02 \text{ mm}^2$. Es wurden stets die in 40 Gesichtsfeldern befindlichen Coxiellen ausgezählt. Die Fläche des Einsatzes, auf die alle in den 15 ml Untersuchungsmaterial befindlichen Coxiellen abzentrifugiert wurden und auf der die 6 Glasplättchen lagen, betrug $3,14 \text{ cm}^2$, das heißt, die 40 Gesichtsfelder ($=0,008 \text{ cm}^2$) sind 392,7mal in der Gesamteinsatzfläche enthalten. Die in den 40 Blickfeldern ausgezählten Coxiellen wurden also immer mit dem Faktor 392,7 multipliziert, um auf den Keimgehalt in den 15 ml Impinger- oder Gelatinefilterflüssigkeit zu kommen. Dieses Ergebnis wurde dann nochmals mit dem Faktor 2 multipliziert, um auf die Ausgangsmenge von 30 ml Impingerflüssigkeit (Gelatinefilter) bezogen werden zu können.

Die mit beiden Verfahren ermittelten Zahlen stellten somit die tatsächliche Anzahl von Keimen dar, die sich in 2 Minuten 20 Sekunden in 30 ml Impingerflüssigkeit, bzw. in 2 Minuten durch Gelatinefilter bei einer definierten Menge vernebelter Keime zurückgewinnen ließen.

3.2.5. Mischantigenverneblung

Um im mikroskopischen Bild die Eindeutigkeit der Coxiellen-diagnose auch beim Vorhandensein von anderen Erregern zu

- . -

demonstrieren, wurde in einem Aerosolversuch ein Gemisch von Coxiellen, *Escherischia coli* und *Staphylococcus aureus* vernebelt. Diese Erreger wurden in der gleichen Weise kultiviert und aufgeschwemmt, wie dies mit *Serratia marcescens* geschah. Das zurückgewonnene Erregergemisch wurde in der Impinger- und der Gelatinefilterflüssigkeit nach Auramin-Färbung fluoreszenzmikroskopisch, bzw. nach Gram-Färbung lichtmikroskopisch, untersucht.

Zu Dokumentationszwecken wurden die Präparate photographiert.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Orientierende Vorversuche mit *Serratia marcescens*

Es wurden drei Vorversuche mit der gleichen Methodik durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab. 2: Vorversuche über die Rückgewinnung
von *Serratia marcescens*

Versuch	Material	Koloniezahl/0,025 ml bei Verdünnung									
		10 ⁻¹	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
I	Ausgangssuspension	+	+	+	+	+	+	315	34	3	0
	Impingerfl.	+	+	+	+	156	18	5	0	0	0
	gelöstes Gelatinefl.	+	+	277	61	18	9	0	0	0	0
II	Ausgangssuspension	+	+	+	+	+	+	+	114	0	0
	Impingerfl.	+	+	+	+	+	192	15	2	0	0
	gelöstes Gelatinefl.	+	+	+	+	+	26	3	0	0	0
III	Ausgangssuspension	+	+	+	+	+	+	+	45	0	0
	Impingerfl.	+	+	+	+	168	75	5	0	0	0
	gelöstes Gelatinefl.	+	+	+	+	149	17	2	0	0	0

+ = Rasenbildung

Die in Tabelle 2 enthaltenen Koloniezahlen in den jeweiligen Verdünnungsstufen spiegeln die Keimzahlen in einem Tropfen

(0,025 ml) wieder. Um auf die tatsächliche Anzahl der in 2 Minuten (bzw. 2 min 20 sec) vernebelten Keime (bzw. zurückgewonnene Keime) zu kommen, mußte dies in einer Umrechnung berücksichtigt werden. Danach ergaben sich die in Tabelle 3 verzeichneten Werte:

Tab. 3: Gesamt-Rückgewinnung von *Serratia marcescens* in 28 l Luft

a)	b)	c)	Rückgewinnungsrate	
Versuch	Verfahren	Ausgangskeimzahl absolut	absolut	% von c
I	Impinger	$7,5 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^{10}$	80
	Gelatinef.	$6,5 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	16,9
II	Impinger	$2,8 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^{11}$	67,8
	Gelatinef.	$2,3 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^{10}$	15,7
III	Impinger	$1,1 \times 10^{11}$	$9,1 \times 10^{10}$	82,7
	Gelatinef.	$9,7 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^{10}$	21,6

Setzt man die Leistungsfähigkeit des Standardimpingers nach der üblichen Norm gleich 100 %, so ergibt sich für das Gelatinefilter folgende prozentuale Leistung:

Im 1. Versuch	21,3 %
" 2. Versuch	23,1 %
" 3. Versuch	26,1 %

In der vorliegenden Versuchsanordnung mit *Serratia marcescens* als Festkeim wurde im Vergleich zum Impingerverfahren (100 %) durch die Gelatinefiltermethode im Durchschnitt eine Rückgewinnungsquote von 23,5 % erreicht.

3.3.2. Hauptversuche mit Coxiella burneti

a) Keimrückgewinnung bis zur niedrigsten erreichbaren Nachweisgrenze

In den Hauptversuchen wurde die Rückgewinnungsrate von Coxiellen untersucht. Um mit den verschiedenen Nachweisverfahren die unterste Grenze der Nachweisbarkeit genau zu erfassen, wurde stufenweise jeweils der Ausgangs-Coxiellengehalt im Aerosol um eine 10er-Potenz vermindert. Um zuverlässige Durchschnittswerte zu erhalten wurden pro Verdünnungsstufe mindestens 2, i.d.R. 3 bis 5 Parallelversuche durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 4 - 8 zusammengestellt.

Tab. 4: Rückgewinnungsrate von *Coxiella burnetii* beim
relativen Filterverfahren (Auremin-Orbin₅)

Versuch Nr.	Ausgangskonzentration		Keimzahl bei Rückgewinnung			Nachweis- methode
	a) pro ml Suspension	b) pro 28 l Aerosol	c) Keime/ ausgezählte Gesichts- felder	d) pro 28 l Aerosol	e) $\frac{c}{b}$ von b	
1			40/80	$1,1 \times 10^7$	14,6	Irescott-
2	$1,4 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	44/80	$9,9 \times 10^6$	13,2	
3			42/80	$9,4 \times 10^6$	12,6	
4			36/80	$8,1 \times 10^6$	10,8	
5			10/80	$2,1 \times 10^6$	20,0	Breed
6	$1,4 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	9/80	$1,9 \times 10^6$	26,0	
7			11/80	$2,5 \times 10^6$	32,9	
8			10/80	$2,1 \times 10^6$	28,4	
9			8/80	$1,8 \times 10^6$	23,6	
10	$4,14 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	0/80	0	0	
11			420/40	$4,9 \times 10^5$	22,4	
12	$4,14 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	351/40	$4,1 \times 10^5$	18,7	
13			392/40	$4,6 \times 10^5$	20,9	
14			54/40	$6,3 \times 10^4$	25,4	Plättchen- zentri- fugation
15	$4,8 \times 10^5$	$2,59 \times 10^5$	43/40	$5,0 \times 10^4$	19,5	
16			46/40	$5,4 \times 10^4$	20,9	
17	$4,5 \times 10^4$	$2,59 \times 10^4$	4/40	$4,7 \times 10^3$	18,8	
18			5/40	$5,8 \times 10^3$	23,5	
19	$4,5 \times 10^3$	$2,59 \times 10^3$	0/40	0	0	

Tab. 5: Rückgewinnungsrate von *Coxiella burnetii* beim Impingerverfahren (Auraminfärbung)

Versuch Nr.	Ausgangskeimzahl		Keimzahl bei Rückgewinnung			Nachweis- methode
	a) pro ml Suspension	b) pro 28 l Aerosol	c) Keime/ ausgezählte Gesichts- felder	d) pro 28 l Aerosol	e) % von b	
1			44/80	$9,9 \times 10^6$	11,2	Prescott-
2	$1,4 \times 10^8$	$8,8 \times 10^7$	34/80	$7,6 \times 10^6$	8,6	
3			38/80	$8,5 \times 10^6$	9,7	
4			34/80	$7,6 \times 10^6$	8,5	
5			9/80	$1,9 \times 10^5$	22,5	Breed
6			6/80	$1,3 \times 10^6$	15,3	
7	$1,4 \times 10^7$	$8,8 \times 10^6$	11/80	$2,5 \times 10^6$	28,3	
8			9/80	$1,9 \times 10^6$	22,5	
9			9/80	$1,9 \times 10^6$	22,5	
10	$4,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	0/80	0	0	Flättchen- zentrifugation
11			283/40	$3,3 \times 10^5$	12,0	
12	$4,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	201/40	$2,3 \times 10^5$	9,1	
13			240/40	$2,8 \times 10^5$	10,9	
14			56/40	$6,59 \times 10^4$	21,9	
15	$4,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	41/40	$4,8 \times 10^4$	16,3	
16			34/40	$4,0 \times 10^4$	13,3	
17	$4,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	2/40	$2,35 \times 10^3$	7,8	
18			3/40	$2,5 \times 10^3$	11,7	
19	$4,8 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	0/40	0	0	

Tab. 6: Rückgewinnungsrate von *Coxiella burneti* beim Gelatinefilterverfahren (Immunofluoreszenz)

Versuch Nr.	Ausgangskeimzahl		Keimzahl bei Rückgewinnung			Nachweis- methode
	a) pro ml Suspension	b) pro 28 l Aerosol	c) Keime/ ausgezählte Gesichts- felder	d) pro 28 l Aerosol	e) % von b	
1	$2,4 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	56/80	$1,26 \times 10^7$	16,8	Prescott- Breed
2			64/80	$1,4 \times 10^7$	19,2	
3			51/80	$1,13 \times 10^7$	15,1	
4			54/80	$1,2 \times 10^7$	16,0	
5	$1,4 \times 10^7$	$7,5 \times 10^6$	9/80	$1,98 \times 10^6$	26,4	
6			8/80	$1,8 \times 10^6$	24,0	
7			10/80	$2,1 \times 10^6$	28,8	
8			9/80	$1,98 \times 10^6$	26,4	
9			8/80	$1,8 \times 10^6$	24,0	
10	$4,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	0/80	0	0	
11	$4,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	361/40	$4,2 \times 10^5$	19,2	Plättchen- zentrifugation
12			323/40	$3,7 \times 10^5$	17,2	
13			340/40	$3,9 \times 10^5$	18,1	
14	$4,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	52/40	$6,1 \times 10^4$	24,4	
15			46/40	$5,4 \times 10^4$	21,6	
16			44/40	$4,17 \times 10^4$	16,6	
17	$4,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	3/40	$3,5 \times 10^3$	14,1	
18			3/40	$3,5 \times 10^3$	14,1	
19	$4,8 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	0/40	0	0	

Tab. 7: Rückgewinnungsrate von *Coxiella burnetii* beim Impingerverfahren (Immunofluoreszenz)

Versuch Nr.	Ausgangskeimzahl		Keimzahl bei Rückgewinnung			Nachweis- methode
	a) pro ml Suspension	b) pro 28 l Aerosol	c) keine/ ausgezählte Gesichts- felder	d) pro 28 l Aerosol	e) % von b	
1			53/80	$1,1 \times 10^7$	13,5	Prescott- Breed
2			42/80	$9,3 \times 10^6$	10,6	
3	$1,4 \times 10^8$	$8,8 \times 10^7$	48/80	$1,0 \times 10^7$	12,2	
4			52/80	$1,1 \times 10^7$	13,2	
5			8/80	$1,8 \times 10^6$	20,4	
6			8/80	$1,8 \times 10^6$	20,4	
7	$1,4 \times 10^7$	$8,8 \times 10^6$	10/80	$2,1 \times 10^6$	24,5	
8			7/80	$1,4 \times 10^6$	16,3	
9			6/80	$1,2 \times 10^6$	14,3	
10	$4,1 \times 10^6$	$2,58 \times 10^6$	0/80	0	0	
11			210/40	$2,4 \times 10^5$	9,8	
12	$4,1 \times 10^6$	$2,58 \times 10^6$	201/40	$2,3 \times 10^5$	9,4	
13			193/40	$2,2 \times 10^5$	8,7	
14			38/40	$4,4 \times 10^4$	14,6	
15	$4,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	34/40	$3,9 \times 10^4$	13,0	
16			32/40	$3,7 \times 10^4$	12,5	Plättchen- zentrifugation
17	$4,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	2/40	$2,3 \times 10^3$	7,8	
18			2/40	$2,3 \times 10^3$	7,8	
19	$4,8 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	0/40	0	0	

Tab. 8: Rückgewinnungsrate von *Coxiella burnetii* bei verschiedenen Verfahren und anschließender Pelletierung

Versuch Nr.	Ausgangskeimzahl		Keimzahl bei Rückgewinnung			Nachweis- methode
	a) pro ml Suspension	b) pro 28 l Aerosol	c) Keime/ ausgezählte Gesichts- felder	d) pro 28 l Aerosol	e) % von b	
20			18/80	$1,2 \times 10^5$	1,6	Gelatine- filter (Prescott- Breed, Auramin- färbung)
21			12/80	$9,0 \times 10^4$	1,2	
22	$1,4 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	136/80	$1,0 \times 10^6$	13,1	
23			12/80	$9,0 \times 10^4$	1,2	
24			24/80	$1,8 \times 10^5$	2,3	
20			19/80	$1,38 \times 10^5$	1,8	Gelatine- filter (Prescott- Breed, Immuno- fluoreszenz)
21			10/80	$7,2 \times 10^4$	0,9	
22	$1,4 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	36/80	$2,7 \times 10^5$	3,6	
23			28/80	$2,1 \times 10^5$	2,8	
24			25/80	$1,8 \times 10^5$	2,4	
20			12/80	$9,0 \times 10^4$	1,0	Impinger (Prescott- Breed, Auramin- färbung)
21			10/80	$7,2 \times 10^4$	0,8	
22	$1,4 \times 10^7$	$8,8 \times 10^6$	21/80	$1,5 \times 10^5$	1,7	
23			32/80	$2,4 \times 10^5$	2,7	
24			19/80	$1,3 \times 10^5$	1,57	
20			15/80	$1,0 \times 10^5$	1,2	Impinger (Prescott- Breed, Immuno- fluor- eszenz)
21			12/80	$9,0 \times 10^4$	1,0	
22	$1,4 \times 10^7$	$8,8 \times 10^6$	24/80	$1,6 \times 10^5$	2,0	
23			20/80	$1,5 \times 10^5$	1,7	
24			17/80	$1,2 \times 10^5$	1,4	

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß bei Anwendung der Prescott-Breed-Nachweismethode die Nachweisgrenze für Coxiellen in der Luft sowohl beim Impinger-, wie auch beim Gelatinefilterverfahren bei einem Keimgehalt von $7 - 8 \times 10^6$ Coxiellen in 28 l Luft liegt. In 1 m^3 Luft müssen also mindestens 10^8 Coxiellen enthalten sein, damit sie zuverlässig mittels der Prescott-Breed-Methode nachgewiesen werden können. Diese Nachweisgrenze wurde sowohl für die Auraminfärbung als auch für die Immunofluoreszenz ermittelt. Mikroskopisch waren in diesem Bereich in 80 durchmusterten Blickfeldern insgesamt ca. 6 - 10 Coxiellen zu finden, d. h. nur in jedem 10. Gesichtsfeld war 1 Keim feststellbar. Eine weitere Keimzahlverminderung in der Luft ergab keine zuverlässige Nachweisquote mehr.

Die Plättchenzentrifugation verbesserte die Nachweisgrenze beim Impinger- und Gelatinefilterverfahren um zwei Zehnerpotenzen auf $2,5 \times 10^4$ Keime in 28 l Luft, bzw. 10^6 Keime/m^3 . Auch hier wurden zwischen der Auraminfärbung und der Immunofluoreszenzmethode keine gravierenden Unterschiede erzielt. Im Bereich der Nachweisgrenze wurden bei beiden Rückgewinnungsverfahren und mikroskopischen Methoden 2 - 5 Coxiellen in 40 Blickfeldern ausgezählt, was ungefähr dem vorigen Nachweisquotienten entspricht.

Die Pelletierungsmethode erwies sich als nicht zuverlässig und nicht praktikabel. In dieser Versuchsreihe wurden wesentlich schlechtere Ergebnisse erzielt, als dies mit der Plättchenzentrifugation der Fall war. Da nie einwandfrei gesichert war, ob beim Absaugen des Überstandes nach der Zentrifugation der Pellet nicht mit abgesaugt wurde und nur ein kleiner Teil der Coxiellen in der Restflüssigkeit zurückblieb, wurde diese Versuchsreihe als nicht zuverlässig reproduzierbar eingestellt. Die bei der Pelletierung erzielten Ergebnisse sind in der Tab. 6 wiedergegeben.

b) Verneblung eines Coxiellen/Bakteriengemisches

Die Untersuchungen dienten dazu, in einem Misch-aerosol von Coxiellen, Staphylokokken und Kolibakterien zu zeigen, daß mit den benutzten mikroskopischen Nachweisverfahren sich die Coxiellen selektiv darstellen ließen. Die Abb. 10 - 13 dokumentieren diese Tatsache.

Abb. 7 gibt auraminge-färbte Coxiellen wieder, wie sie bei einer vernebelten Keimmenge von 10^9 /ml/in 28 l Luft in der Gelatinefilterflüssigkeit nachweisbar waren. Die Coxiellen sind als leuchtend gelbe Stäbchen auf schwarzem Untergrund zu erkennen.

Abb. 8 zeigt auraminge-färbte Coxiellen in einem nicht vollständig gelösten Gelatinefilterteil. Typisch ist die Ansammlung von Coxiellen im nicht vollständig gelösten Filtermaterial.

Abb. 9 zeigt eine Aufnahme des zurückgewonnenen, auramin-gefärbten Keimgemisches (Coxiellen, Staphylokokken, Kolibakterien) im Fluoreszenzmikroskop. Deutlich hervortretend sind nur die 3 leuchtenden Coxiellen; die im Ausstrich vorhandenen Staphylokokken und Kolibakterien sind nicht als solche zu erkennen.

Abb. 10 zeigt einen Ausstrich in der Färbung nach Gram. Sichtbar sind lediglich Staphylokokken und Kolibakterien, Coxiellen sind nicht erkennbar.

Vergleichend zur Auraminfärbung wurden Ausstriche des zurückgewonnenen Aerosolgemisches auch fluoreszenzserologisch nach Überschichtung mit konjugiertem Coxiellen-Antiserum untersucht. Dabei wurden in der Immunofluoreszenz im Prinzip die gleichen, klaren, selektiven Darstellungen der Coxiellen erhalten, wie nach Auraminfärbung. Lediglich die Leuchtkraft war bei der Auraminfärbung etwas stärker.

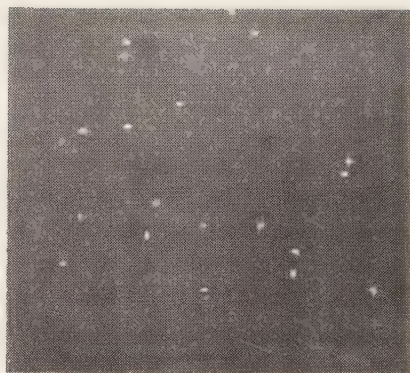


Abb. 7: *Coxiella burnetii*
(Auraminfärbung)
nach Auflösung des
Gelatinefilters



Abb. 8: *Coxiella burnetii*
(Auraminfärbung)
nach unvollständiger
Auflösung des
Gelatinefilters



Abb. 9: Fluoreszierende
Coxiellen in einem
Gemisch mit Staphy-
lokokken und *E.coli*
(Auraminfärbung)

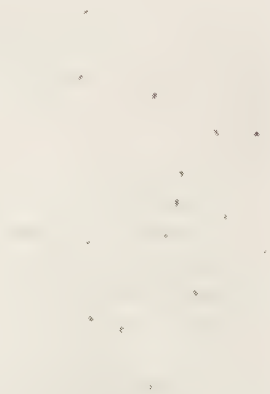


Abb. 10: Coxiellen (nicht
sichtbar) in einem
Gemisch mit Staphy-
lokokken und *E.coli*
(Gram-Färbung)

3.4. Besprechung und vergleichende Auswertung der Ergebnisse

a) Vergleich der verschiedenen Färbemethoden

Einen Vergleich zwischen Auramin-Färbung und Immunofluoreszenz nach der Prescott-Breed-Methode bei mit Gelatinefilter- und Impingerflüssigkeit präparierten Objektträgern unter Zugrundelegung der errechneten Durchschnittswerte aus mehreren Parallelversuchen zeigt Abb. 11.

Bei einer vernebelten Coxiellenmenge von $10^7/28$ l Luft erwies sich, daß die Nachweisquote der Coxiellen nach Färbung mit Auramin etwas geringer war als mit dem fluoreszenzserologischen Verfahren. Wurde die Keimmenge pro 28 l Luft auf 10^6 reduziert, ließ sich mit der Auraminfärbung dagegen eine etwas höhere prozentuale Rückgewinnungsrate erzielen.

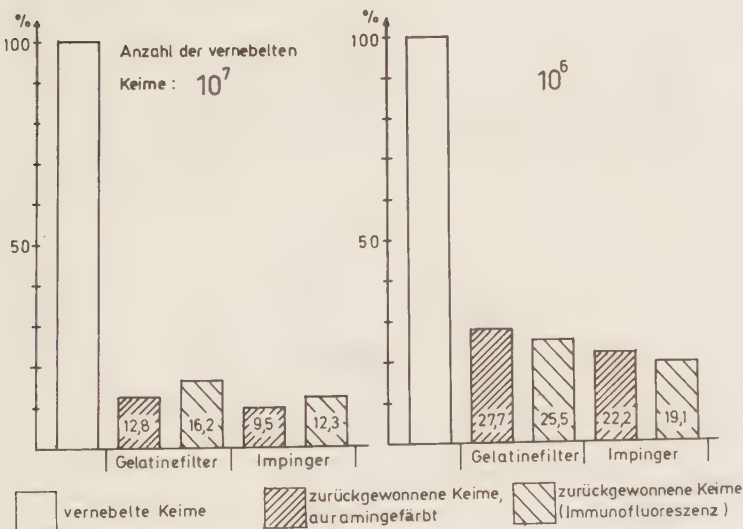


Abb.11: Prozentuale Rückgewinnung beim Prescott-Breed-Verfahren im mikroskopischen Direktnachweis mit der Auraminfärbung und Immunofluoreszenz

Abb.12 zeigt einen Vergleich der beiden fluoreszenzmikroskopischen Methoden nach Plättchenzentrifugation der zurückgewonnenen Coxiellen. Dabei war in allen Verdünnungsstufen bis zur Nachweisgrenze die Auraminfärbung etwas überlegen. Am ausgeprägtesten war dies im Bereich der Nachweisgrenze (10^4 Keime/28 l Luft).



Abb.12: Prozentuale Rückgewinnung nach Plättchenzentrifugation
 ischen Direktnachweis mit Auramin-Färbung
 und Immunofluoreszenz

Die Anfärbung und Auswertung des Untersuchungsmaterials nach der STAMP-Färbung brachte nicht den gewünschten Erfolg. Mit den im Lichtmikroskop schwach rot leuchtenden Coxiellen war nie eine exakte quantitative Auswertung möglich. Aus diesem Grund wurde diese Färbemethode nach dem Erhalt von zu unterschiedlichen Ergebnissen nicht mehr weiter zum Nachweis herangezogen.

b) Prozentuale Rückgewinnung bei den verschiedenen Verfahren

Um die verschiedenen Verfahren besser miteinander vergleichen zu können, wurden für die jeweiligen Parallelversuche, für die gleiche Ausgangskeimzahlen benützt worden waren, die Durchschnittswerte der prozentualen Rückgewinnungsquoten errechnet. Unter Zugrundelegung dieser Mittelwerte ergibt sich die in Tabelle 9 zusammengestellte Übersicht.

Methode	Coxiellen- gehalt im Aerosol	Mittlere prozentuale Nachweisquote			
		Impinger- Verfahren		Gelatinefilter- verfahren	
		Auramin	Immuno- fluores.	Auramin	Immuno- fluoresz.
Prescott- Breed	ca. 8×10^7	9,5 %	12,4 %	12,8 %	16,8 %
	ca. 8×10^6	22,2 %	19,2 %	27,8 %	25,9 %
Plätt- chen- zentrifu- gation	ca. $2,3 \times 10^6$	10,6 %	9,3 %	20,6 %	18,1 %
	ca. $2,3 \times 10^5$	17,1 %	13,3 %	21,9 %	20,8 %
	ca. $2,8 \times 10^4$	9,7 %	7,8 %	21,1 %	14,1 %

Tab. 9: Vergleich der prozentualen Rückgewinnungsquoten der Coxiellen in Abhängigkeit zum Nachweisverfahren

Die Pelletierung der Coxiellen im Untersuchungsmaterial ergab so geringe und unterschiedliche prozentuale Rückgewinnungsraten, daß diese Methode wegen der unzureichenden quantitativen Auswertbarkeit nicht weiter untersucht wurde.

c) Leistungsvergleich zwischen Impinger- und Gelatinefilterverfahren

Wie aus Tab. 9 und Abb. 13 zu ersehen ist, war bei allen durchgeführten Versuchen die Leistungsfähigkeit des Gelatinefilters bei der Rückgewinnung von *Coxiella burneti* der des Impingers sehr deutlich überlegen. Die durchschnittliche prozentuale Ausbeute betrug bei einer angenommenen 100%igen Rückgewinnung durch den Impinger im Prescott-Breed-Verfahren mit Gelatinefiltern in der Auraminfärbung 130,8 % (Streuung zwischen 116 und 169 %), und in der Immunofluoreszenz 137,9 % (Streuung zwischen 117 und 181 %).

Im Plättchenzentrifugations-Verfahren wurden nach Auramin 177 % (Streuung zwischen 116 und 241 %) und in der Immunofluoreszenz 176,3 % (Streuung zwischen 132 und 208 %) der Leistungsfähigkeit des Impingers erreicht. Insgesamt wurde eine durchschnittliche prozentuale Ausbeute durch das Gelatinefilter bei der Plättchenzentrifugation von 176,6 % erzielt (Abb. 13).

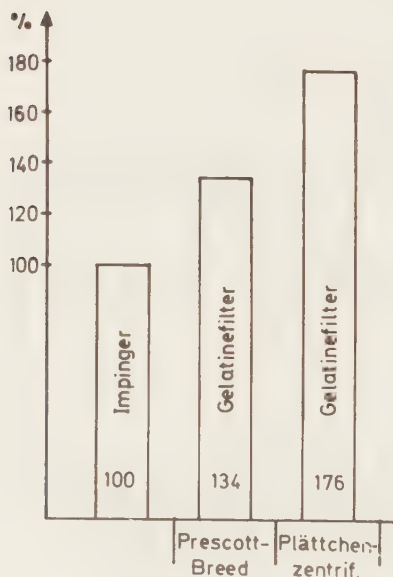


Abb. 13: Leistungsvergleich zwischen dem Impinger (100 %) und dem Gelatinefilter beim PRESCOTT-BREED-Nachweis und der Plättchenzentrifugation

Ver- such Nr.	Gelatine- filter, Immunofluor- eszenz	Gelatine- filter, Auramin- filter	Nachweismethode
1	124,4 ‰	130,3 ‰	Prescott-Breed
2	181,1 ‰	153,4 ‰	
3	123,7 ‰	129,8 ‰	
4	121,2 ‰	127,1 ‰	
5	129,0 ‰	121,7 ‰	
6	117,0 ‰	169,0 ‰	
7	117,5 ‰	116,0 ‰	
8	161,0 ‰	126,0 ‰	
9	167,0 ‰	104,0 ‰	
10	/	/	
11	196,0 ‰	186,6 ‰	Plättchenzentrifugation
12	182,0 ‰	205,4 ‰	
13	208,0 ‰	191,0 ‰	
14	167,0 ‰	116,0 ‰	
15	166,0 ‰	119,0 ‰	
16	132,0 ‰	157,0 ‰	
17	180,0 ‰	241,0 ‰	
18	180,0 ‰	200,0 ‰	
19	/	/	
20	150,0 ‰	156,8 ‰	Pelletierung (10 000 U/min) + Prescott-Breed
21	111,0 ‰	148,1 ‰	
22	180,0 ‰	770,5 ‰	
23	164,6 ‰	44,4 ‰	
24	171,4 ‰	146,4 ‰	

Tab. 9: Leistungsvergleich zwischen Gelatinefilter-
verfahren und Impinger (als 100 ‰ angenommen)
bei den verschiedenen Nachweisverfahren

Abb. 14 gibt den Leistungsvergleich zwischen dem Impinger- und dem Gelatinefilterverfahren unter Berücksichtigung aller Versuche (außer Pelletierung) wieder. Mit 154 % Keimausbeute ist das Gelatinefilterverfahren bei Coxiellenrückgewinnung dem Impinger (100 %) überlegen.

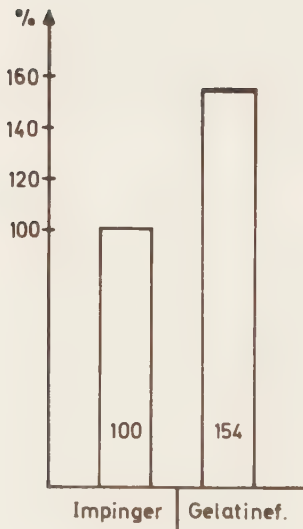


Abb. 14: Leistungsvergleich
zwischen Impinger und
Gelatinefilter
(alle Versuche berücksichtig)

4. Diskussion

4.1. Aerosolversuche mit *Serratia marcescens*

Durch die Aerosolversuche mit *Serratia marcescens* (S.m.) sollte der Aufbau des Versuches durchgetestet und festgestellt werden, in welchen Größenordnungen, im Vergleich zu bereits erschienenen Ergebnissen, sich bei dieser Versuchsanordnung die Keimrückgewinnungsraten bewegten. S.m. ist ein durch Umweltfaktoren leicht beeinflussbarer, aber international oft verwendeter Testkeim, der für die Durchführung solcher Vorversuche besonders geeignet erschien.

Die Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Impingers und des Gelatinefilters bei der Rückgewinnung vermehrungsfähiger Keime erbrachte Ergebnisse, die mit denen anderer Autoren weitgehend übereinstimmten. Es dokumentierte sich mit diesem Testkeim die wesentlich höhere Leistungsfähigkeit des Impingers gegenüber dem Gelatinefilter deutlich. Bei einer angenommenen 100%igen Sammelleistung des Impingers wurde für das Gelatinefilter nur ein Prozentsatz von 23,5 % ermittelt.

Dieser Wert liegt allerdings immer noch höher als der von PETRAS (1966) angegebene. Dieser Autor konnte in Aerosolversuchen durch das Gelatinefilter nur 8,8 % der Ausbeute des Standard-Impingers mit *Serratia-marcescens* als Testkeim erreichen. Verwendete PETRAS dagegen *Bac. subtilis* als Testkeim, erhöhte sich die Leistungsfähigkeit des Gelatinefilters auf 114 %. Dieser enorme Leistungsunterschied beruht auf der längeren Überlebenszeit von *Bac. subtilis*. Der Austrocknungseffekt, der bei der Benutzung des Gelatinefilters auftritt, spielt daher offensichtlich für die unterschiedliche Sammelleistung des Filters bei verschiedenen Testkeimen eine große Rolle (PETRAS, 1966). Um diesem Effekt teilweise entgegenzuwirken und die Leistungsfähigkeit des Gelatinefilters zu steigern, wurde von ihm S.m. mit Zusätzen von Substanzen vernebelt (z.B. 7 % meso-Inosit), die den Prozeß der Zellaustrocknung verlangsamen.

Aus diesem Grunde wurde auch in meinen Versuchen mit 7%igem meso-Inosit-Zusatz gearbeitet.

Auch NOLLER und SPENDLOVE (1956) erzielten bei der Filtration von vegetativen Mikroorganismen (*Serratia marcescens*) durch das Gelatinefilter eine geringere Wirksamkeit als durch den Impinger. Wurden jedoch Sporen von *B. globigii* in der Aerosolkammer zurückgewonnen, war das Gelatinefilter dem Impinger gleichwertig. NOLLER und SPENDLOVE vermuteten allerdings, daß S.m. wahrscheinlich beim Aufprall auf die Filteroberfläche geschädigt wird.

HURTIGNE (1967) verglich die Leistung des Gelatinefilterverfahrens mit der des Standard-Impingers in Ställen. Das durchschnittliche Ergebnis der Leistung des Gelatinefilters aus allen Ställen liegt mit 58,0 % deutlich unter der des Impingers. Das bessere Abschneiden des Gelatinefilters in diesen Stallversuchen zu dem in der eigenen Arbeit in der Aerosolkammer ermittelten Ergebnis (23,5 % Gelatinefilterleistung) ist dadurch zu erklären, daß im Stall ein großer Anteil der Luftkeime über hohe Überlebensraten verfügt und dadurch eine bessere quantitative Ausbeute erzielt wird.

Auch KEMPMANN (1970) stellte eine geringere Leistungsfähigkeit des Gelatinefilters (86,7 %) gegenüber dem Impinger (100 %) bei Versuchen in einem Legehennenstall fest.

Untersuchungen über die Abhängigkeit der Leistungsfähigkeit des Gelatinefilters und des Impingers von der Raumtemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit wurden von NOLLER und SPENDLOVE (1956), KEMPMANN (1970) und KNOCHE (1971) durchgeführt. Nach KNOCHE (1971) ließen Temperatur und relative Feuchte der Stallluft insofern einen gewissen Einfluß erkennen, als die Ausbeute des Impingers mit abnehmender Temperatur und mit zunehmender relativer Feuchte geringfügig anstieg. KEMPMANN, sowie NOLLER und SPENDLOVE jedoch konnten keinen Einfluß dieser Umweltfaktoren feststellen.

Bei den eigenen Untersuchungen blieben diese Punkte unberücksichtigt, es wurde konstant bei ca. 20 °C Temperatur und 30 % relativer Luftfeuchtigkeit gearbeitet. In den Hauptversuchen war mit einem Einfluß solcher Faktoren von vornherein nicht zu rechnen, da inaktivierte Coxiellen vernebelt wurden.

Die Ergebnisse der eigenen Vorversuche stimmten mit den Befunden anderer Autoren gut überein. Das zeigte, daß die gesamte Versuchsanordnung (Aerosolkammer, Verneblungs- und Rückgewinnungsverfahren) geeignet war, die Hauptversuche mit Coxiellen-Aerosolen durchzuführen.

4.2. Aerosolversuche mit Coxiella burneti

4.2.1. Nachweisgrenze der Coxiellen

Bei der Verneblung von Coxiella burneti in vermehrungsfähiger Form besteht ein erhebliches Infektionsrisiko für das Personal. Aus diesem Grunde wurden die Versuche mit formalininaktivierten Coxiellen durchgeführt, deren quantitativer Nachweis in Flüssigkeiten (Impingerflüssigkeit bzw. gelöste Gelatinefilter) mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung (Auraminfärbung, Immunofluoreszenz) und der Auszählmethode nach PRESCOTT-BREED keine Schwierigkeiten bot.

Mit der PRESCOTT-BREED-Methode konnten bei einem Gehalt von ca. 8×10^7 Coxiellen in 28 Liter Luft in der auf 1 cm² ausgestrichenen, zurückgewonnenen Impinger- bzw. Gelatinefilterflüssigkeit von 0,025 ml in 80 Gesichtsfeldern durchschnittlich 40 (Auraminfärbung) bzw. 47 Coxiellen (Immunofluoreszenz) nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß im Durchschnitt ungefähr in jedem 2. Gesichtsfeld ein Erreger als hellgrün leuchtender Keim zu erkennen war.

Bei einer vernebelten Keimmenge von ca. $8 \times 10^6/28$ l Luft war die Nachweisgrenze dieser Methode aber bereits erreicht. Hier wurden in 80 Blickfeldern durchschnittlich nur noch 8 (Immunofluoreszenz) bzw. 9 (Auraminfärbung) Coxiellen festgestellt. Es mußten somit bis zu 10 Blickfelder

durchmustert werden, bevor ein Keim sichtbar wurde (unabhängig von der Färbemethode). Damit war für diese Nachweismethode die Grenze der absoluten Diagnose von Coxiellen aus der Luft erreicht. Auf einen m^3 Luft bezogen, ergab sich als minimal nachweisbarer Keimgehalt $7,6 \times 10^8/m^3$.

wie gering der Wert dieses Verfahrens selbst bei Auraminfärbung oder fluoreszenzserologisch ist, geht aus einem Vergleich mit den normalen Keimzellen in der Luft hervor.

Bei Keimzahlbestimmungen vermehrungsfähiger Keime aus Stallluft fand KEMPFMANN (1970) im Plattenzählverfahren 4140 - 77160 Keime/l Luft, d.h. $4,1 \times 10^6$ - $7,7 \times 10^7$ Keime/ m^3 Luft. Eine ähnliche große Menge von Luftkeimen, nämlich 10^6 - 10^7 Keime/ m^3 stellte KNOCH (1971) in der Stallluft fest. Der nachweisbare Coxiellengehalt liegt somit über der Gesamtzahl, die normalerweise in der Stallluft vorkommt.

Eine gewisse Verbesserung des Nachweises stellt die Plättchenzentrifugation nach LEYK dar. Durch die weitere mechanische Anreicherung der in dem Sammelmedium von Impingern oder Gelatinefiltern befindlichen Coxiellen konnte in meinen Versuchen noch eine Senkung der Nachweisgrenze im direkten mikroskopischen Verfahren um 2 Zehnerpotenzen erreicht werden. Bei einer vernebelten Keimmenge von 10^4 in 28 Liter Luft (bzw. $10^6/m^3$) wurden in 40 Blickfeldern durchschnittlich 2 - 3 Coxiellen erkannt, d.h. es müßten etwas mehr als 10 Blickfelder durchmustert werden, um einen Erreger festzustellen.

Berücksichtigt man, daß durch eine Verlängerung der Ansaugzeit unter praktischen Verhältnissen eine sehr viel größere Luftmenge als in meinen Versuchen gesammelt und gefiltert werden kann, dann dürfte mit der Plättchen-zentrifugationsmethode ein Verfahren zur Verfügung stehen, mit dem noch relativ wenig Coxiellen/m³ Luft nachgewiesen werden können. Der zeitliche und technische Aufwand bei dieser Methode wird allerdings größer als beim PRESCOTT-BREED-Verfahren, bei dem man ca. 30 Minuten benötigt. Bei der Plättchenzentrifugation vergehen von der Luftprobenentnahme bis zur Diagnose dagegen etwa 2 Stunden. Eine Übersicht der Nachweisgrenzen bei den benützten Verfahren im Aerosolkammerversuch vermittelt Tabelle 10.

Tab. 10: Nachweis-Grenzen von *Coxiella burneti* in Aerosolen bei verschiedenen mikroskopischen Direktverfahren

Zahl vernebelter Keime in 28 l Luft	PRESCOTT-BREED-Verfahren	PRESCOTT-BREED-Verfahren und Pelletierung	Plättchen-zentrifugation
ca. 8×10^7	+	+	
ca. 8×10^6	+	+	
ca. $2,3 \times 10^6$	-	-	+
ca. $2,8 \times 10^5$			+
ca. $2,8 \times 10^4$			+
ca. $2,8 \times 10^3$			-

4.2.2. Vergleich der verschiedenen Färbungsmethoden

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Färbungen, wie Auramin-, STAMP-Färbung und der Immunofluoreszenz erbrachte, daß die STAMP-Färbung für die grobe qualitative Beurteilung eines Ausstrichspräparates ausreichen kann. Die Coxiellen treten im lichtmikroskopischen Bild als winzige, punktförmige, rot gefärbte Partikel in Erscheinung. Dies genügt im allgemeinen, um *Coxiella burneti* z.B. in infizierten Dottersäcken und Zellkulturen qualitativ nachzuweisen. RHODE (1973) erzielte dabei mit der STAMP-Färbung sogar ähnliche Ergebnisse wie mit der Auraminfärbung.

Meine Versuche hatten jedoch zum Ziel, exakte quantitative Aussagen bei alleiniger mikroskopischer Betrachtung zu machen. Dazu eignete sich die STAMP-Färbung aber infolge der variablen Farbstoffaufnahme der Coxiellen und der daraus oftmals resultierenden unsicheren Darstellung nicht. Als Direktverfahren kamen daher nur die Auraminfärbung und die direkte Immunofluoreszenz in Frage.

In den gesamten Versuchsreihen erwies sich die Auraminfärbung, sowohl bei der Anfärbung der Objektträger bei der PRESCOTT-BREED-Methode als auch bei der Plättchenzentrifugation, der Immunofluoreszenz gleichwertig. Im Fluoreszenzmikroskop wurden bei allen Nachweisverfahren in fast allen Verdünnungsstufen der zurückgewonnenen Suspensionen in auramingefärbten Ausstrichen sogar 1 - 2 Coxiellen mehr in 40 bzw. 80 Blickfeldern entdeckt, als nach Behandlung der entsprechenden Präparate mit konjugiertem Antiserum. Die etwas höhere Keimausbeute mit der Auraminfärbung war vor allem auf die sehr kräftig-gelbe Fluoreszenz zurückzuführen, durch die die kurze, gedrungene Stäbchenform der Coxiellen klar und leuchtend im mikroskopischen Bild wiedergegeben wurde. So war stets, auch bei Vorhandensein von ganz vereinzelt Coxiellen und bei Verunreinigungen, eine klare Diagnose möglich.

In der direkten Immunofluoreszenztechnik dagegen war die Brillanz, mit der die markierten Coxiellen im auflichtfluoreszenzmikroskop aufleuchteten, geringer. Die Zellumrisse und die Morphologie von Einzelzellen waren i.d.R. nicht so deutlich sichtbar wie nach Auraminfärbung. Daran änderte auch die Verwendung verschiedener selbst hergestellter und über den Handel bezogener Konjugate nichts. Der Vorteil der Immunofluoreszenztechnik liegt aber zweifelsohne in ihrer hohen Spezifität.

4.2.3. Rückgewinnung der vernebelten Coxiellen

Die höchste Rückgewinnungsrate der vernebelten Coxiellen wurde in den eigenen Versuchen mit durchschnittlich 20,5 % mit Hilfe des Gelatinefilters und der PRESCOTT-BREED-Methode erzielt. Mit dem Impinger wurden bei der gleichen Nachweismethode 15,7 % der vernebelten Coxiellen zurückgewonnen. Der Nachweis der Coxiellen in der Gelatinefilterflüssigkeit durch die Plättchenzentrifugation ergab mit 19,4 % (11,3 % Impinger) eine etwas geringere durchschnittliche prozentuale Rückgewinnungsrate. Als Quelle einer möglichen Verlustquote wird die Einschaltung eines weiteren Arbeitsschrittes (Zentrifugation) angenommen.

Meine Ergebnisse lassen sich mit Untersuchungen anderer Autoren nicht vergleichen, weil andere Nachweismethoden, Versuchsanordnungen und Testkeime Anwendung fanden. Ein ganz wesentlicher Unterschied besteht vor allem darin, daß andere Untersucher mit vermehrungsfähigen und auf Agarplatten kultivierbaren Keimen arbeiteten. MAY und HARKER (1957) fanden in der Aerosolkammer unter Verwendung von künstlichen Aerosolen mit *Serratia marcescens* und *Bac. subtilis* für den Standard-Impinger eine mittlere Ausbeute von 97,6 %. KNOCH (1971) ermittelte sogar eine Ausbeute von Keimen in Stallluft durch den Impinger von 99,8 %. Die hohe Ausbeute durch den Impinger bei Verwendung von kultivierbaren Bakterien wurde in den eigenen

Vorversuchen mit *Serratia marcescens*, in denen eine durchschnittliche Rückgewinnungsrate von 76,8 % erzielt wurde, im Prinzip bestätigt. Es ist anzunehmen, daß die Ursache der niedrigen prozentualen Rückgewinnung der abgetöteten Coxiellen in der Verwendung der völlig anderen Nachweisverfahren nach der Keimsammlung zu suchen ist. Offensichtlich ist die Verlustquote beim direkten mikroskopischen Nachweis erheblich höher als bei kulturellen Verfahren. Auf Undichtigkeit in den Impinger- bzw. Gelatinefiltersystemen beruhte sie wahrscheinlich nicht, denn Untersuchungen der nachgeschalteten Waschflaschen auf Coxiellengehalt verliefen ergebnislos.

4.2.4. Leistungsvergleich zwischen Impinger und Gelatinefilter

Die durchschnittliche Leistung des Gelatinefilters im Vergleich zu der des Impingers war mit 154 % zu 100 % ein zu erwartendes Ergebnis. Durch die Unempfindlichkeit von *Coxiella burnetii* gegen äußere Einflüsse fallen Fehlerquellen durch Austrocknung des Keimes auf Gelatinefilter, wie sie PETRAS (1966) bei *Serratia marcescens* beschrieb, nicht ins Gewicht. Wurde von ihm *Bac. subtilis* in der Aerosolkammer vernebelt, stieg auch hier die Gelatinefilterleistung von 8,8 % (S.m.) auf 114,8 %.

NOLLER und SPENDLOVE (1956) beschrieben eine gleichwertige Wirksamkeit des Gelatinefilters im Vergleich zum Impinger bei der Rückgewinnung von unempfindlichen *Bac. globigii*-Sporen. Mit *Serratia marcescens* war die Ausbeute durch das Gelatinefilter, nach ihrer Meinung durch Aufprallschädigung bedingt, geringer. Die schlechtere Ausbeute des Gelatinefilters bei anderen Autoren (HURTIENNE 1967, KEMPMANN 1970) ist durch die Verwendung von vegetativen Mikroorganismen, und nicht von Sporen, erklärbar.

5. Zusammenfassung

Nach Verneblung von *Coxiella burneti* (C.b.) in inaktivierter Form in einer geschlossenen Aerosolkammer wurde versucht, die unterste Nachweisgrenze der Coxiellen in mikroskopischen Direktverfahren festzustellen. Die Rückgewinnung der Coxiellen aus dem Aerosol erfolgte vergleichend unter Verwendung des Standard-Impingers und von Gelatinefiltern.

Als quantitative Nachweismethode von C.b. in der Impingerflüssigkeit bzw. in den gelösten Gelatinefiltern diente die mikroskopische Auszählung nach PRESCOTT-BREED ohne und mit Zentrifugation sowie die Auszählung von Gesichtsfeldern nach mechanischer Anreicherung (Plättchenzentrifugation). Zur Keimzählung wurden die Präparate nach STAMP bzw. mit Auramin gefärbt, sowie mit konjugiertem Coxiellen-Antiserum behandelt und vergleichend beurteilt. Diese Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

- a) Die Nachweisgrenze von *Coxiella burneti* (aerosoliert) lag bei Anwendung des Impingers und des Gelatinefilters in Verbindung mit der Plättchenzentrifugation nach Auraminfärbung und direkter Immunfluoreszenztechnik bei einem Gehalt von 10^6 Coxiellen/m³ Luft.
- b) Von den drei untersuchten Färbemethoden war für die quantitative Beurteilung der Präparate die STAMP-Färbung ungeeignet. Nach Auraminfärbung ließen sich die Coxiellen am besten und sichersten auszählen. In der direkten Immunfluoreszenz zeigten die Coxiellen eine etwas schwächere Fluoreszenz.
- c) Die höchste Rückgewinnungsquote betrug 20,5 % der vernebelten Coxiellen und wurde mit Gelatinefilter und der PRESCOTT-BREED-Auszählmethode erreicht. Dabei waren die Ergebnisse nach Auraminfärbung und in der Fluoreszenzserologie fast gleich.
- d) Das Gelatinefilter-Verfahren war leistungsfähiger als das Impinger-Verfahren. Setzt man die Leistungsfähigkeit des Standard-Impingers mit 100 % an, dann betrug sie für das Gelatinefilter im Durchschnitt 154 %.

6. Literatur

1. ABINATI, F.R. Symposium on Q-Fever; The varied epidemiology of Q-fever-infections. In: Symposium on Q-Fever by Commission on Rickettsial Disease Armed Forces Epidemiological Board. Medical Science Publication Nr. 6, Walter Reed Army Institute of Research, Walter Reed Army Medical Center (Washington, D.C.) 1959
2. ALBRECHT, J. Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen in Aerosolformen. Z. Aerosol-Forsch., 7, 50 - 61, 1958
3. ANNACKER, R.L., Electron microscopic observations
FUKUSHI, K., of Coxiella burnetii in the chick
PICKENS, E.G., yolk sac.
LACKMANN, D.B. J. Bact., 88, 1130 - 1138, 1964
4. ANDERSEN, A.A. New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles. J. Bact., 76, 471 - 484, 1958
5. BABUDIERI, B. Q-Fever: A Zoonosis; Advances in Vet. Science, 5, 81, 1959
6. BABUDIERI, B. e Infezione sperimentale da
MOSCOVICI, C. Coxiella burnetii per via alimentare e per via transconiuntivale. Rend. Ist.super. sanità, 18, 65 - 69, 1955

7. BABUDIERI, S. e
SIO I-VALLI, G. Studi e ricerche su alcuni episodi
di febbre Q verificatisi nella
Repubblica di San Marino
Rend. Ist. super. sanità, 14, 430 - 459,
1951
8. BECHT, H. u.
HESS, E. Zur Epizootologie, Diagnostik und
Bekämpfung des Q-Fiebers beim Rind.
Schweiz. Arch. Tierhk., 106, 389 - 399,
1964
9. BINGEL, F. u.
ENGELHARDT, H. Genügen unsere Pasteurisierungs-
verfahren zur Unschädlichmachung
des Q-Fiebererregers in der Kuhmilch?
Arch. Hyg., 136, 417 - 425, 1952
10. BRACHMANN, P.S.
et al. Standard samplers for assay of
airborne microorganism
Science, 144, 1295, 1964
11. BURDET, F.K. and
FREEMANN, M. Experimental studies on the virus
of "Q"-fever
Med. J. Australia, 2, 299 - 305,
1937
12. CHAMBERLAIN, A.C. Deposition and Uptake by Cattle
of Airborne Particles
Nature 225, 99 - 100, 1970
13. COONS, A.H.,
CROUCH, H.J.,
JONES, R.N.,
BERLINER, E. The demonstration of pneumococcal
antigen in tissues by the use of
fluorescent antibody
J. Immunol., 45, 159 - 170, 1942
14. CORBAZ, R. Spores dans l'atmosphère.
Pathol. et microbiol., 32, 114 - 122,
1960

15. DERRICK, E.H. Neue Erkenntnisse über die Epidemiologie
des Q-Fiebers in Queensland.
Schweiz. Z. Path. u. Bakt., 24, 72 - 79,
1961
16. DERRICK, E.H. "Q"fever, a new fever entity:
Clinical features, diagnosis and
laboratory investigation.
Med. J. Australia, 2, 281 - 199, 1937
17. EHRLICH, R., Evaluation of Slit Sampler in
MILLER, S., Quantitative Studies of Bacterial
IDOINE, L.S. Aerosols.
Appl. Microbiol. 14, 328 - 330,
1965
18. GÄRTNER, H. und Über den Nachweis von Coli-Bakterien
SCHYMA, D. und Salmonellen aus dem Wasser mit
einem löslichen Ultrafilter.
Arch. Hyg., 154, 81 - 87, 1961
19. GIMENEZ Gramfärbung von Coxiella burneti.
J. Bact., 90, 934 - 835, 1965
20. GUNDERMANN, K.O. Krankenhaushygiene und infektiöser
Hospitalismus.
Med. Habil.-Schrift Kiel, 1969
21. HARPER, G.J. Airborne micro-organism: Survival
tests with four viruses.
J. Hyg., 59, 479 - 486, 1961

22. HENDERSON, D.W. An apparatus for the study of
 air-borne infection.
 J. Hyg., 50, 52 - 68, 1952
23. HILBIG, V. Erfahrungen mit dem Andersen-Sampler
 bei der Untersuchung des Luftkeim-
 gehaltes eines Versuchstierstalles.
 Vet.med.Diss. FU Berlin, 1972
24. HILLIGER, H.G. Die Eignung des Casella-Schlitz-
 sammlers für den Bakteriennachweis
 in Stallluft.
 Ges.-Ing., 90, 51 - 53, 1969
25. HUEBNER, R.J. and Q-fever studies in Southern California.
 BELL, J.A. Summary of current results and a
 discussion of possible controlmeasures.
 J. Amer. Med. Assoc., 145, 301, 1951
26. HURTIENNE, H. Vergleiche zwischen mehreren Verfahren
 zur Bestimmung der Keimgehalte der
 Stallluft unter verschiedenen Bedingungen.
 Vet.Med.Diss. FU Berlin, 1967
27. KAMINJOLO, J.S. Serologische Untersuchungen über die
 Verteilung von Antikörpern gegen die
 Viren der Mucosal Disease, der
 infektiösen Rhinotracheitis bzw.
 pustulären Vulvovaginitis und der
 Parainfluenza-3 bei Rindern in Hessen.
 Vet.Med.Diss. Gießen, 1969

28. KEMPMANN, M. Vergleichende Untersuchungen zur Luftkeimgehaltsbestimmung mit dem Standard-Impinger-Verfahren und dem Gelatinefilter-Verfahren in einem Legehennenstall.
Vet.Med.Diss. FU Berlin, 1970
29. KIRBERGER, E. Die Resistenz der *Coxiella burneti* in vitro.
Z. Tropenmed. u. Parasit., 3, 77 - 86, 1951
30. KLEINSORGEN, A. Versuche zur peroralen Übertragung des Q-Fieber-Erregers (*Coxiella burneti*) durch natürlich infizierte Milch auf Versuchstiere (Meerschweinchen).
Vet.Med.Diss. Gießen, 1972
31. KLIEWE, H. und WASIELEWSKI E. Physikalische Eigenschaften von keimtötenden Aerosolen und künstlichen Keimnebeln.
Z. Hyg., 134, 1 - 23, 1952
32. KRUSE, H. Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Keimgehaltes der Luft
Ges.-Ing., 69, 199, 1948
33. KULAGIN, S.M., SOKOLOVA, N.F., FEDOVOVA, N.J. Resistance of R.b. to some physical and chemical agents.
Z. Mikrobiol. (Moskau) 27, 28 - 32, 1956

34. LIDWELL, C.H. and A modification of the Andersen
NOBLE, A.C. sampler for use in occupied
environments.
Appl. Bact., 28, 280 - 282, 1965
35. LIESEDLISTER, K. Schlachthofepidemien durch Q-Fieber
Mh. Tierhk., 2, 237, 1950
36. LUOTO, L. and Q-fever studies in southern California
HUEBNER, R.J. IX.
Isolation of Q-fever organisms from
parturient placentas of naturally
infected dairy cows.
Publ. Health Rep., 65, 541 - 544,
1950
37. MAIER, K.H. und Wasserlösliche Filter und ihre
VOGGEL, A. Verwendung in der Luftkeimuntersuchung.
Glas- und Instrumententechnik,
Fachz. f. d. Lab. 9, 119 - 126, 1965
38. MAYER, H. Beobachtungen zu einer Q-Fieber-
Schlachthausepidemie in Württemberg.
Dtsch. Med. Wschr., 74, 1476, 1949
39. MITCHELL, R.B., A soluble gelatine foam sampler
FULTON, J.D., for airborne microorganisms at
ELLINGSON, H.V. surface levels.
Am. J. publ. Health., 44, 1334 - 1339,
1954

40. MITCHELL, R.B., The Development of a soluble
STUMM, P.W., Collection Filter for Microorganisms
DORRIS, H.W., Present in Air.
TIMMONS, D.E. Zbl. nach MITCHELL et al. 1954
41. NOLLER, E. and An appraisal of the soluble gelatin
SPENDLOVE, J.C. foam filter as a sampler for bacterial
aerosols.
App. Microbiol., 4, 300 - 306, 1956
42. NÜCKEL, H. Der menschliche Atemtrakt als
Aerosolfilter
Zbl. biol. Aerosol-Forsch.,
10, 207 - 235, 1962
43. ORMSBEE, R.A., Relationship among complementfixing
LACKMAN, D.B., values, infections, endpoints and
PICKENS, E.G. death curves in experimental
Coxiella burneti infection.
J. Immunol., 67, 257 - 263, 1951
44. PARKER, R.R., Q-fever: A brief survey of the
BELL, E.J., problem.
STOEHNER, H.G. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 114, 55 - 60,
124 - 130, 1949
45. PEPYS, J., Farmer's Lungs, thermophilic
JENKINS, P.A., actinomycetes as a source of
FESTENSTEIN, G.N., "farmer's lung hay antigen".
GREGORY, P.H., Lancet, 2, 607, 1963
LACEY, M.E.,
SKINNER, F.A.

46. PETRAS, E. Zur Isolierung von Luftkeimen
mittels feinporiger Filter.
Arch. Mikrobiol., 55, 94 - 109, 1960
47. PETRAS, E. Zum Problem der Bestimmung des
Gesamtkeimgehaltes der Luft.
Jahrbuch der Fraunhofer-Gesellsch.,
München, 1967, S. 64 - 68
48. PHILIPP, C.B. Observation on experimental
Q-fever.
J. Parasitol., 34, 457 - 464, 1948
49. POPCIVICI, V. Serologische Untersuchungen über
die Verbreitung des Q-Fiebers in
einigen Bezirken der Rumänischen
Volksrepublik.
Landw. Zbl., Abt. IV, 6, 1241, 1961
50. REHACEK, J. and Elimination of Coxiella burneti in
BREZINA, R. Faeces and the Transmission of this
agent to small Rodents by the
Peroral Route.
Bull. Wld. Health Org., 39, 973 - 994,
1968
51. REIFFERSCHIED, H. Das atmosphärische Aerosol: "Luft-
technischer Wirkungskomplex."
in: Handbuch der Bäder- u. Klima-
heilkunde XIV, 2c.
Schattauer, Stuttgart (1957), S. 549 - 577.

52. REIFFERSCHIED, H. Der biologische Anteil des Aerosols und seine meßtechnische Erfassung.
Ber. Dtsch. Witterd., 12, 92 - 95, 1963
53. MAY, K.R. Calibration of a modified Anderson bacterial aerosol sampler
Appl. Microbiol., 12, 37 - 43, 1964
54. RHODE, E. Vergleichende Untersuchungen über die Vermehrung von *Coxiella burnetii* in Zellkulturen unter Berücksichtigung verschiedener mikroskopischer Nachweisverfahren.
Vet. Med. Diss., Gießen, 1973
55. RIVERS, T.H.M. Viral and rickettsial infections of man.
Lippincott & Co.
Philadelphia, London 1948
56. ROTTER, M. und KOLLER, W. Sammlung von Luftkeimen mit Gelatine-Filtern.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., B 157, 257 - 270, 1973
57. SARTORIUS Klar- und Sterilfiltration
Sterilitätskontrolle
Luftkeimuntersuchung
SM 12 Ein Handbuch der Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen, 1972

58. SCHAAF, J. Zur Epizootologie und Epidemiologie
des Q-Fiebers in Deutschland.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 69, 547 - 551,
1962
59. SCHAAF, J. Zur Diagnose des Q-Fiebers bei Tieren.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 79, 25 - 31,
1972
60. SCHELLNER, H. Q-Fiebererkrankungen des Menschen
im Anschluß an Geburtshilfe bei
einer Kuh.
Proc. 15. Internat. Vet. Kongr.
IB, Bd. 77, 1953
61. SCHLIESER, Th. Das Q-Fieber und seine hygienische
Bedeutung.
Schlacht- und Viehhof Zeitung,
69, 344 - 347, 1969
62. SCHLIESER, Th. Das Q-Fieber; Erfahrungen bei einer
Epidemie in München.
Landarzt, 44, 1198, 1968
63. SCHMIDT, U. Serologische Untersuchungen über das
Vorkommen von Q-Fieber-Antikörpern
bei Kindern u. Schafen.
Vet. Med. Diss., München 1969
64. SCHRODER Luftkeimbestimmung durch
Filtrationsverfahren.
Glas- u. Instrumententechn., 12,
747 - 748, 1968

65. SHMAJEWA, S.M.,
PETRISCHTSCHewa
P.A.,
PTSCHELKINA, A.A. Blutsaugende Zecken als Träger des
Q-Fiebererregers in verschiedenen
Landschaftszonen der UdSSR.
Zschr. Mikrob. Epidem. Immunbiol.
(Mosk.), 5, 28 - 32, 1964
66. SOTOW, A.P. Erfahrungen bei der Untersuchung
des Q-Fiebers und der Tularämie
landwirtschaftlicher Nutztiere.
Landw. Zbl. Abt. IV, 6, 670, 1961
67. TEUFEL, P. Diskuss. Beitrag 12. Tag Fachgruppe
Lebensmittelhyg. der DVG
4. 10. 1968, Salzburg
68. TYLER, M.E. and
SHIPE, E.L. Bacterial aerosol samplers
1. Development and evaluation of
the All-Glass-Impinger.
Appl. Microbiol., 7, 337 - 349, 1959
69. URBACH, H. und
SPROSSIG, M. Die fluoreszenzmikroskopische
Darstellung der Rickettsia burneti
und ihre photographische Wiedergabe.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 161, 39 - 44,
1954
70. WAGNER, M. Fluoreszierende Antikörper und ihre
Anwendung in der Mikrobiologie.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967

71. JAMMER, H.U. Untersuchung über den Keimgehalt
in der Luft von pharmazeutischen
Laboratorien.
Pharma. acta Helvet., 44,
517 - 534, 1969
72. WEISE, H.J. Zur Epidemiologie des Q-Fiebers beim
Menschen. Ergebnisse einer Erhebung
über 230 nach BSG gemeldeten
Erkrankungsfällen (1967 - 69).
Bundes-Ges.Bl., 14, 6/7, 1971
73. WEISS, E. and
PIETRYK, H.C. Growth of Coxiella burneti in monolayer
cultures of Chick embryo entodermal cells.
J. Bact., 72, 235 - 241, 1956
74. WHO Rickettsial infections: Q-fever.
3. Bericht des FAO-WHO Sachverständigen
Ausschusses für Zoonosen Nr. 74, 1967
75. WILLIAMS, R.L.O. Spread of air-borne bacteria pathogenic
for man. In: Airborne microbes,
edited by Gregory, F.H. and Monteith, I.L.
Cambridge University Press, 1967
76. GOLF, H.S.
et al. Sampling microbiological aerosols
(Publ. Health Monogr., Nr. 60)
in Publ. Health Rep., 74, 1959
77. YOUNG, F.W. Q-fever in Artesia, California.
Calif. Med., 69, 89 - 90, 1948

Herrn Professor Dr. Th. Schliesser möchte ich für die Überlassung des Themas, sowie für seine Ratschläge und wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Arbeit danken.

Herrn Dr. W. Leyk danke ich für die ständige Betreuung bei allen Arbeiten.

Die sorgfältige Anfertigung der fotografischen Arbeiten verdanke ich Fräulein J.-M. Schultze.

Lebenslauf

Am 21. September 1943 wurde ich, Ralph Scheffler, als ältester Sohn des Dr.med, Dr.med.dent Claus Scheffler und seiner Ehefrau Helga, geb. Jacobs, in Breslau geboren.

Nach der Flucht (1945) wurde ich 1949 in der Volksschule in Scheidegg/Allgäu eingeschult. 1954 erfolgte der Wechsel in das Gymnasium in Lindenberg/Allgäu. Nach Umzügen besuchte ich die Gymnasien in Karlsruhe/Baden und Gießen/Hessen. Das Abitur bestand ich 1965 in Gießen am Liebig-Gymnasium.

Von 1965 - 1967 leistete ich meinen Wehrdienst ab und schied als Leutnant d.R. aus der Bundeswehr aus.

Seit dem Herbst 1967 studierte ich an der Justus-Liebig-Universität in Gießen Veterinärmedizin und wurde am 1. 12. 1972 als Tierarzt bestellt. Seit Januar 1973 war ich Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen. Vom 1. 1. 1973 bis zum 31. 7. 1973 war ich neben meiner Tätigkeit am Institut als Fleischbeschau-tierarzt am Frankfurter Schlacht- und Viehhof tätig. Seit 1. 8. 1973 bin ich wissenschaftlicher Bediensteter an obigem Institut in Gießen.

